

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 319**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2006 E 06723678 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1861118**

54 Título: **Identificación de antígenos asociados a superficies para el diagnóstico y la terapia de tumores**

30 Prioridad:

24.03.2005 DE 102005013846

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

05.06.2015

73 Titular/es:

**BIONTECH AG (100.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;
TÜRECI, ÖZLEM;
KOSLOWSKI, MICHAEL;
HELFTENBEIN, GERD;
USENER, DIRK y
SCHLÜTER, VOLKER**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 537 319 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

Identificación de antígenos asociados a superficies para el diagnóstico y la terapia de tumores

A pesar de los planteamientos interdisciplinarios y el uso exhaustivo de modalidades terapéuticas, las enfermedades cancerosas siguen perteneciendo a las causas principales de muerte. Los nuevos conceptos terapéuticos apuntan a influir el sistema inmune propio del paciente en el concepto terapéutico general usando vacunas de tumor recombinantes y otras medidas específicas como terapias de anticuerpos. Un prerrequisito para el éxito de una estrategia tal es el reconocimiento de antígenos o epítomos específicos de un tumor o asociados a un tumor por el sistema inmune del paciente, cuyas funciones efectoras deben intensificarse mediante intervención. Las células tumorales difieren biológicamente, de manera sustancial, de sus células no malignas de origen. Estas diferencias se deben a modificaciones genéticas adquiridas durante el desarrollo del tumor y también dan lugar, entre otras, a la formación de estructuras moleculares, modificadas cualitativa o cuantitativamente en las células cancerosas. Si tales estructuras asociadas con un tumor son reconocidas por el sistema inmune específico del hospedero que porta el tumor, se habla de antígenos asociados a tumor.

En el reconocimiento específico de antígenos asociados a tumor se involucran mecanismos celulares y humorales, los cuales representan dos unidades funcionalmente interconectadas: linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ reconocen antígenos procesados que existen en las moléculas del MHC (Major Histocompatibility complex o complejo principal de histocompatibilidad = antígenos de histocompatibilidad) clases II y I, respectivamente, mientras que los linfocitos B producen moléculas de anticuerpo circulantes, las cuales se enlazan directamente con antígenos no procesados.

El significado clínico-terapéutico potencial de los antígenos asociados a tumor resulta del hecho que el reconocimiento de antígenos en células neoplásicas por el sistema inmune conduce a la iniciación de mecanismos efectores citotóxicos, y en presencia de células auxiliares T puede causar la eliminación de las células cancerosas (Pardoll, Nat. Med. 4:525-31, 1998). Por consiguiente, un objetivo central de la inmunología de tumor es definir molecularmente estas estructuras. La naturaleza molecular de estos antígenos ha sido enigmática por mucho tiempo. Solamente después de desarrollar técnicas de clonación correspondientes ha sido posible cribar librerías de expresión de ADNc de tumores de manera sistemática para antígenos asociados a tumor analizando las estructuras diana de linfocitos T citotóxicos (CTL) (van der Bruggen et al., *Science* 254:1643-7, 1991) usando autoanticuerpos circulantes (Sahin et al., *Curr. Opin. Immunol.* 9:709-16, 1997) en calidad de sondas. Para este propósito se prepararon librerías de expresión de ADNc a partir de tejido fresco de tumor y se expresaron de manera recombinante como proteínas en sistemas adecuados. Inmunofectores aislados de pacientes, más precisamente clones de CTL con patrones de lisis específicos para tumor, autoanticuerpos circulantes se utilizaron para clonar los antígenos respectivos.

Por medio de estos planteamientos, en los últimos años se ha definido una gran cantidad de antígenos en diferentes neoplasias. La clase de los antígenos de testículo/cáncer (CTA). CTA y los genes que los codifican (genes de testículo/cáncer o CTG) se definen por su patrón de expresión característico (Türeci et al., *Mol. Med. Today* 3:342-9, 1997). Éstos no se encuentran en tejidos normales, excepto testículos y células germinales, pero se expresan en un número de malignomas humanos de modo no específico para el tipo de tumor sino con diferente frecuencia en entidades tumorales de orígenes muy diferentes (Chen & Old, *Cancer J. Sci. Am.* 5:16-7, 1999). Las actividades de suero contra CTA tampoco se encuentran en controles sanos sino sólo en pacientes con tumor. Esta clase de antígenos, principalmente debido a su distribución de tejido, es particularmente valiosa para proyectos inmunoterapéuticos y se ensaya en estudios clínicos actuales sobre pacientes (Marchand et al., *Int. J. Cancer* 80:219-30, 1999; Knuth et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46: pp. 46-51, 2000).

Sin embargo, para la identificación de antígenos, los procedimientos clásicos presentados antes utilizan inmunofectores (autoanticuerpos circulantes o clones CTL) de pacientes regularmente con cáncer ya avanzado en calidad de sondas. De una serie de datos se desprende que los tumores, por ejemplo para la inducción de tolerancia y de anergia de células T y que durante el transcurso de la enfermedad se pierden del repertorio inmunofector, pierden aquellas especificidades que pueden provocar un inmunorreconocimiento efectivo. Los estudios actuales en pacientes aún no han producido una evidencia sólida de acción real de los antígenos asociados a tumor previamente encontrados y utilizados. Por consiguiente, no puede excluirse que las proteínas que evocan respuestas inmunes espontáneas son estructuras diana equivocadas.

El objetivo de la presente invención fue proporcionar estructuras diana para diagnóstico y terapia de enfermedades cancerosas.

Este objetivo se logra de acuerdo con la invención por medio del objeto de las reivindicaciones.

De acuerdo con la invención, se persiguió una estrategia para identificar y proporcionar antígenos expresados en asociación con un tumor y los ácidos nucleicos que los codifican. Esta estrategia se basa en evaluar bases de datos de proteína y ácidos nucleicos humanos con respecto a antígenos potenciales, específicos del cáncer, que son

accesibles sobre la superficie celular. La definición de los criterios de filtro necesarios para esto, junto con una metodología de alto rendimiento para analizar todas las proteínas, si es posible, forman la parte central de la invención. Por medio de la minería de datos primeros se produce una lista, tan completa como sea posible, de todos los genes conocidos que se examinan de acuerdo con el principio básico "gen a ARNm a proteína" para establecer la presencia de uno o más dominios transmembrana. Esto es seguido por una búsqueda de homología, una clasificación de los aciertos en grupos específicos de tejido (entre otros, tejidos tumorales) y una inspección de la existencia real del ARNm. Finalmente, las proteínas que se identifican de esta manera se evalúan en su activación aberrante en tumores, por ejemplo mediante análisis de expresión y procedimientos químicos de proteína.

La minería de datos es un método conocido para identificar genes asociados a tumor. En las estrategias convencionales, sin embargo, usualmente se sustraen electrónicamente los transcriptomas de las librerías de tejidos tumorales suponiendo que los genes que permanecen son específicos de tumor (Schmitt et al., *Nucleic Acids Res.* 27:4251-60, 1999; Vasmatzis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:300-4, 1998; Scheurle et al., *Cancer Res.* 60:4037-43, 2000).

El concepto de acuerdo con la invención, que ha demostrado ser mucho más exitoso, se basa, no obstante, en utilizar minería de datos para extraer electrónicamente todos los genes que codifican antígenos específicos de cáncer, los cuales son accesibles en la superficie celular, y luego evaluar dichos genes en expresión ectópica en tumores.

De esta manera, la invención se basa en una estrategia para identificar genes expresados en tumores de manera diferencial. Esta estrategia combina minería de datos de librerías públicas de secuencias ("in silico") con subsiguientes investigaciones experimentales en laboratorio de evaluación ("wet bench" o banco de trabajo para ensayos por vía húmeda).

Una estrategia combinada con base en diferentes textos bioinformáticos hizo posible de acuerdo con la invención la identificación del gen descrito en el ejemplo 1, el cual codifica un antígeno disponible en la superficie celular, específico de cáncer. La identificación y la provisión de este gen asociado a tumor y del producto génico codificado de esta manera se efectuaron de modo independiente de su acción inmunogénica.

Tal como se representa detalladamente en el ejemplo 1, el antígeno asociado a tumor de la invención puede usarse debido a su expresión específica de tumor como marcador diagnóstico para enfermedades cancerosas en el área de la cabeza-cuello y para leucemias. La solicitud PCT WO2005/021793 describe marcadores fetales de ARN en sangre materna que pueden emplearse para diagnóstico prenatal del síndrome de Down. En este contexto también se describe la secuencia de ácido nucleico denominada "SEQ ID NO: 13", la cual es idéntica a la secuencia de ácido nucleico de la invención según SEQ ID NO: 13. Además, la solicitud PCT WO98/37094 describe la clonación de los más diversos ADNcs y especula que estos ADNcs y los productos de traducción derivados de estos podrían tener una importancia diagnóstica y terapéutica. En este contexto también se menciona el clon de ADNc denominado como "DA306_4", el cual contiene un marco de lectura abierta que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de la invención según SEQ ID NO: 14. En la WO98/37094 no pueden deducirse indicaciones de que una proteína correspondiente se exprese de una manera específica al tumor en el caso de enfermedades tumorales en el área de la cabeza-cuello y en leucemias. Finalmente, en efecto la solicitud PCT WO2005/030250 menciona que el antígeno asociado a tumor de la invención se expresa en tejidos específicos de tumor. Sin embargo, en la WO2005/030250 no se encuentra indicación alguna de que las enfermedades tumorales del área cabeza-cuello y las leucemias se caractericen por una expresión o sobreexpresión del antígeno asociado a tumor de la invención.

El antígeno asociado a tumor, identificado de acuerdo con la invención, presenta una secuencia de aminoácidos que se codifican por un ácido nucleico, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 13 del protocolo de secuencias. El antígeno asociado a tumor, identificado de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 14 del protocolo de secuencias.

La presente invención se refiere en general al uso del antígeno asociado a tumor descrito detalladamente en el ejemplo 1, del ácido nucleico que lo codifica o de ácidos nucleicos que están dirigidos contra los ácidos nucleicos codificantes, o de anticuerpos que están dirigidos contra el antígeno asociado a tumor, identificado según la invención, para el diagnóstico. Esta utilización se refiere, por ejemplo, a métodos para el diagnóstico y el control del desarrollo de carcinomas en el área de cabeza-cuello o de leucemias.

La propiedad del antígeno asociado a tumor, identificado según la invención, que se localiza sobre o en la superficie celular, lo caracteriza como estructura diana adecuada para el diagnóstico. Principalmente adecuada para esto es una parte del antígeno asociado a tumor, identificado según la invención, que corresponde a la fracción de no transmembrana, principalmente a la fracción extracelular del antígeno o está comprendida por ésta. De esta manera, de acuerdo con la invención, se prefiere una parte de los antígenos asociados a tumor, identificados según la invención que corresponden a la fracción de no transmembrana de los antígenos o está comprendida por ésta, o una parte correspondiente de los ácidos nucleicos que codifican los antígenos identificados según la invención para un

diagnóstico. De manera similar se prefiere el uso de anticuerpos que están dirigidos contra una parte del antígeno asociado a tumor, identificado según la invención, el cual corresponde a la fracción de no transmembrana del antígeno o está comprendido por la misma.

Las variantes de empalme pueden utilizarse como dianas para el diagnóstico de enfermedades tumorales.

5 Mecanismos muy diferentes pueden causar que se produzcan variantes de empalme, por ejemplo:

- la utilización de sitios variables de iniciación de transcripción
- la utilización de exones adicionales
- el empalme completo o incompleto de un único exón o de varios exones,
- secuencias reguladoras de empalme modificadas por medio de mutación (supresión o generación de
- 10 nuevas secuencias de donantes/aceptoras),
- la eliminación incompleta de secuencias de intrón.

El empalme modificado de un gen da lugar a una secuencia de transcripción modificada (variante de empalme). La traducción de una variante de empalme en la región de su secuencia modificada da lugar a una proteína modificada que puede distinguirse claramente en estructura y función de la proteína original. Las variantes de empalme

15 asociadas a tumor pueden producir transcripciones asociadas a tumor y proteínas/antígenos asociados a tumor. Estos pueden utilizarse como marcadores moleculares para detectar células tumorales. La detección de células tumorales, por ejemplo en la sangre, suero, médula ósea, esputo, lavado bronquial, secreciones corporales y biopsias de tejidos, puede llevarse a cabo de acuerdo con la invención, por ejemplo, después de extraer ácidos nucleicos por amplificación de PCR con oligonucleótidos específicos de variante de empalme.

20 Para la detección, todos los sistemas de detección dependientes de secuencia son adecuados de acuerdo con la invención. Aparte de PCR, estos son, por ejemplo, sistemas de chip génico/microarreglo, Northern-Blot, ensayos de protección de ARNs (RDA) y otros. Todos los sistemas de detección tienen en común que la detección se basa en una hibridación específica con al menos una secuencia de ácido nucleico específica de variante de empalme. La detección de células tumorales también puede efectuarse de acuerdo con la invención, sin embargo, por medio de anticuerpos que reconocen un epítipo específico codificado por la variante de empalme. Para la preparación de los anticuerpos pueden usarse péptidos para inmunizar, los cuales son específicos para esta variante de empalme. La detección de células tumorales también puede efectuarse mediante anticuerpos que reconocen variantes de glicosilación modificadas de modo específico para el tumor. Para la generación de anticuerpos de este tipo pueden utilizarse regiones peptídicas que se distinguen en células tumorales y las células sanas dependiendo de la glicosilación. Mediante deglicosilación endógena de residuos de azúcar N-acoplados la asparagina se transforma en ácido aspártico. De acuerdo con la invención, las proteínas descritas en la presente pueden modificarse en secuencia de una manera específica para el tumor y de esta manera tienen diferentes propiedades bioquímicas y de enlazamiento al anticuerpo. Para la inmunización son adecuados particularmente los aminoácidos que presentan claras diferencias de epítipo con la/las variante(s) del producto genético que se forma(n) preferiblemente en células sanas. La detección de las células tumorales con anticuerpos puede llevarse a cabo aquí sobre una muestra aislada del paciente o como imágenes con anticuerpos administrados por vía intravenosa.

25

30

35

Además de la utilidad diagnóstica, las variantes de empalme que tienen epítipos nuevos o modificados son dianas atractivas para la inmunoterapia. Los epítipos pueden utilizarse para apuntar a anticuerpos monoclonales terapéuticamente activos o linfocitos T. En inmunoterapia pasiva, los anticuerpos o linfocitos T que reconocen epítipos específicos para variante de empalme se transfieren aquí de manera adoptiva. La generación de anticuerpos, tal como en el caso de otros antígenos, también puede efectuarse utilizando tecnologías estándar (inmunización de animales, estrategias panorámicas para aislar anticuerpos recombinantes) utilizando polipéptidos que incluyen estos epítipos. De manera alternativa, para la inmunización pueden usarse ácidos nucleicos que codifican oligo- o polipéptidos que incluyen estos epítipos. Diferentes técnicas para la generación *in vitro* o *in vivo* de linfocitos T específicos de epítipos se conocen y se describen detalladamente (por ejemplo, Kessler JH, et al. 2001, Sahin et al., 1997) y se basan igualmente en la utilización de oligo- o polipéptidos que contienen los epítipos específicos para variantes de empalme, o ácidos nucleicos que los codifican. Los oligo- o polipéptidos que contienen los epítipos específicos para variante de empalme o los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos, también pueden usarse para aprovecharse como sustancias farmacéuticamente activas en el caso de la inmunoterapia activa (vacunación, terapia de vacunas).

40

45

50

La expresión aberrante de genes en células tumorales puede basarse en modelos de metilación modificados de sus promotores (De Smet C. et al., Mol. Cell Biol. 24:4781-90,2004; De Smet C., et al., Mol. Cell Biol. 19:7327-35, 1999; De Smet C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:7149-53, 1996). Estas diferencias en metilación pueden usarse

como marcadores indirectos para el estado del gen respectivo modificado en el tumor. Por consiguiente, el incremento o el decrecimiento de metilaciones de base dentro de la región promotora pueden usarse para propósitos de diagnóstico.

5 En el presente caso también se describen dominios de proteína modificados post-traslacionales, tales como por ejemplo glicosilaciones o miristilaciones. Este tipo de modificaciones puede conducir a un modelo diferencial de reconocimiento de un antígeno mediante, por ejemplo, un anticuerpo y reconocer diferentes estados asociados a la enfermedad según las circunstancias. Ante todo esta diferenciación de un antígeno también puede utilizarse empleando anticuerpos tanto de modo diagnóstico como también terapéutico. Para células tumorales se ha publicado que la degeneración celular asociada a un tumor puede dar lugar a modificaciones cambiadas post-traslacionales (Durand & Seta, Clin. Chem. 46:795-8052000; Granovsky et al., Nat. Med. 6:306-312, 2000).
10 Principalmente los modelos de glicosilación se modifican fuertemente en las células tumorales. Estos epítomos especiales pueden diferenciar células tumorales de células no carcinógenas a modo diagnóstico. Si un epítomo modificable de modo post-traslacional se glicosila en células normales, no degeneradas y se desglicosila en células tumorales, esta situación permite el desarrollo de un anticuerpo terapéutico específico para el tumor.

15 El análisis de modificaciones de proteína puede efectuarse en el Western-Blot. Ante todo, las glicosilaciones que regularmente tienen un tamaño de varios kDa conducen a una masa total mayor de la proteína diana de lo que puede separarse en la SDS-PAGE. Para detectar enlaces O- y N-glicosídicos específicos, se incuban lisados de proteína con O- y N-glicosilasas (de acuerdo con las instrucciones del fabricante, por ejemplo PNGasa, endoglicosidasa F, endoglicosidasa H, Roche Diagnostics) antes de la desnaturalización utilizando SDS. A
20 continuación se efectúa un Western Blot. Al disminuir el tamaño de una proteína diana, después de la incubación con una glicosidasa puede detectarse una glicosilación específica y de esta manera también se analizan la especificidad para el tumor de una modificación. Son de interés particular las áreas de proteína que se glicosilan de manera diferencial en células tumorales células sanas. Diferencias de este tipo en la glicosilación han sido descritas hasta ahora, no obstante, para pocas proteínas de superficie celular (por ejemplo, Muc1).

25 Además, la invención se refiere a métodos para el diagnóstico o el control, es decir para la determinación de la regresión, del desarrollo y/o del inicio de una enfermedad cancerosa que se distingue por la expresión o expresión anormal de uno o de varios antígenos asociados a tumor.

Los métodos de diagnóstico y/o métodos para el control según la invención se refieren en general al uso de medios para la detección y/o la determinación o control de la cantidad de (i) un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor, o de una parte del mismo y/o de (ii) el antígeno asociado al tumor o de una parte del mismo, en una muestra biológica aislada de un paciente.

30 En un aspecto, la invención se refiere a un método para el diagnóstico o el control de una enfermedad cancerosa que se caracteriza porque se sobreexpresa un antígeno asociado a tumor en tejido tumoral en comparación con tejidos sanos comparables, el cual comprende

35 (i) la detección de un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor, y/o

(ii) la detección del antígeno asociado al tumor,

40 en una muestra biológica aislada de un paciente, en cuyo caso el antígeno asociado al tumor presenta una secuencia que se codifica por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 13 del protocolo de secuencias, en cuyo caso la enfermedad cancerosa es un carcinoma en el área de la cabeza-cuello o una leucemia.

A manera de ejemplo, el método (i) puede comprender la puesta en contacto de la muestra biológica con un medio que se enlaza específicamente al ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor, o al antígeno asociado al tumor, y (ii) la detección de la formación de complejo entre el medio y el ácido nucleico, o el antígeno asociado al tumor.

45 Métodos de diagnóstico pueden utilizar el antígeno asociado al tumor, identificado según la invención, incluso como marcador de pronóstico a fin de predecir una metástasis, por ejemplo ensayando la conducta de migración de células y de ahí un desarrollo empeorado de la enfermedad, mediante lo cual se hace posible, entre otras, una terapia más agresiva.

50 De esta manera, la invención se refiere a un método para determinar la regresión, la progresión o el inicio de una enfermedad cancerosa que se distingue por la expresión o la expresión anormal del antígeno asociado al tumor, identificado según la invención, que comprende el control de una muestra de un paciente que presenta la enfermedad o la sospecha de que contrajo la enfermedad.

5 Una detección de un ácido nucleico o de una parte del mismo, o una determinación o control de la cantidad de un ácido nucleico o de una parte del mismo, pueden efectuarse de acuerdo con la invención con una sonda de polinucleótido que se hibrida específicamente con el ácido nucleico o la parte del mismo, o puede efectuarse mediante amplificación selectiva del ácido nucleico o de la parte del mismo. La sonda de polinucleótido comprende, por ejemplo, una secuencia de 6-50, principalmente 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico.

10 En el contexto del método de diagnóstico se efectúa, por ejemplo, una amplificación selectiva del área promotora o de una parte de un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor y se presenta en forma de ADN genómico después de tratar con un reactivo que contiene bisulfito. Antes de un tratamiento con el reactivo que contiene bisulfito, el ácido nucleico puede aislarse de una muestra de un paciente que va a investigar. Los oligonucleótidos usados en una amplificación de este tipo presentan una secuencia que se enlaza al ácido nucleico tratado con el reactivo que contiene bisulfito, que preferentemente son completamente complementarios al mismo. Los oligonucleótidos se adaptan preferentemente a un grado diferente de una metilación del ácido nucleico y producen productos de amplificación diferenciables.

15 Una detección del antígeno asociado a tumor o de una parte del mismo, o una determinación o control de la cantidad de un antígeno asociado a tumor o de una parte del mismo puede efectuarse con un anticuerpo que se enlaza específicamente al antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo.

El antígeno asociado a tumor que va a detectarse, o una parte del mismo, puede existir en un complejo con una molécula de MHC, principalmente una molécula de HLA.

20 La sonda de polinucleótido, o el anticuerpo, usada para una detección o para una determinación o control, está marcada, por ejemplo, de manera detectable, en cuyo caso el marcador detectable puede ser, por ejemplo, un marcador radioactivo o marcador enzimático.

25 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo que esta acoplado con un medio de diagnóstico para la preparación de una composición farmacéutica para el diagnóstico o el control de una enfermedad cancerosa, el cual se caracteriza porque el antígeno asociado a tumor se sobreexpresa en el tejido tumoral en comparación con tejidos sanos comparables, y el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que se codifica por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 13 del protocolo de secuencias; la enfermedad cancerosa es un carcinoma en el área de cabeza-cuello o una leucemia. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de un anticuerpo natural.

30 El experto en la materia puede usar los reconocimientos de los procesos de la invención incluso en conexión con procedimientos de tratamiento.

35 Métodos de tratamiento concebibles son métodos para el tratamiento de un paciente que tiene un enfermedad cancerosa, la cual se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, los cuales comprenden (i) la identificación de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor, identificado según la invención, y dicho ácido nucleico se expresa por células que se asocian con la enfermedad, (ii) la transfección de una célula hospedera con el ácido nucleico o una parte del mismo, (iii) el cultivo de las células hospederas transfectadas para un expresión del ácido nucleico (esto no es obligatorio para alcanzar una alta tasa de transfección) (iv) la introducción de las células hospederas o de un extracto de las mismas en el paciente en una cantidad adecuada para aumentar la inmuno-reacción contra las células del paciente que se asocian con la enfermedad. Un método así puede comprender además la identificación de una molécula de MHC que presenta el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo, en cuyo caso la célula hospedera expresa la molécula de MHC identificada y presenta el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo. La inmuno-reacción puede comprender una reacción de células B o una reacción de células T. Además, una reacción de células T puede comprender la producción de células T citolíticas y/o células T auxiliares, las cuales son específicas para las células hospederas que presentan el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo o son específicas para células del paciente que expresan el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo.

40 Otro método de tratamiento concebible es un método para el tratamiento de una enfermedad cancerosa que se caracteriza por la expresión o la expresión anormal del antígeno asociado a tumor, identificado de acuerdo con la invención, y el cual comprende (i) la identificación de células del paciente que expresan cantidades anormales del antígeno asociado al tumor, (ii) el aislamiento de una muestra de las células, (iii) el cultivo de las células y (iv) la introducción de las células en el paciente, en una cantidad adecuada para iniciar una inmuno reacción contra las células.

45 Oligonucleótidos que se hibridan con el ácido nucleico identificado según la invención pueden usarse como sondas genéticas. Moléculas de ácido nucleico en la forma de cebadores de oligonucleótido o sondas competentes que se hibridan con el ácido nucleico identificado según la invención pueden usarse para encontrar ácidos nucleicos que

son homólogos de los ácidos nucleicos identificados según la invención. Para encontrar ácidos nucleicos homólogos pueden emplearse: amplificación PCR, hibridación Southern y Northern. La hibridación puede efectuarse en condiciones de baja severidad, mejor en condiciones de media severidad y en el mejor de los casos en condiciones de alta severidad. El término "condiciones severas" se refiere a condiciones según la invención que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos.

Fragmentos inmunogénicos del antígeno asociado a tumor, identificado de acuerdo con la invención, pueden enlazarse a un receptor humano de HLA o a anticuerpos humanos. Un fragmento tal tiene, por ejemplo, una secuencia de al menos 6, principalmente de al menos 8, de al menos 10, de al menos 12, de al menos 15, de al menos 20, de al menos 30 o de al menos 50 aminoácidos.

En el ejemplo 1 se describen péptidos que pueden utilizarse para la preparación de anticuerpos y presentan una secuencia seleccionada del grupo compuesto de SEQ ID NOs: 287-290.

En otro aspecto, los métodos y las utilidades según la invención se refieren a un medio que se enlaza al antígeno asociado a tumor, identificado según la invención. En una modalidad preferida, el medio es un anticuerpo. En otras modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un fragmento de un anticuerpo. Un anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de un anticuerpo.

Por otra parte, las utilidades según la invención se refieren a un conjugado entre un medio de la invención que se enlaza al antígeno asociado a tumor identificado según la invención, o un anticuerpo según la invención y un medio o sustancia de diagnóstico. A manera de ejemplo, el medio de diagnóstico es una toxina.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit para detectar una enfermedad cancerosa que se caracteriza porque un antígeno asociado a tumor se sobreexpresa en tejido tumoral en comparación con un tejido sano comparable, en cuyo caso el que comprende medios para detectar

(i) el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor, y/o

(ii) el antígeno asociado a tumor,

en cuyo caso el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que se codifica por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 13 del protocolo de secuencias, y la enfermedad cancerosa es un carcinoma en el área de cabeza-cuello o una leucemia. En una modalidad, los medios para detectar el ácido nucleico son moléculas de ácido nucleico para la amplificación selectiva del ácido nucleico que comprenden por ejemplo una secuencia de 6-50, principalmente 10-30 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención se describe un gen que se expresa de manera selectiva o se expresa de manera aberrante en células tumorales y representa un antígeno asociado a tumor.

Este gen y/o sus productos genéticos y/o sus derivados y/o partes pueden ser estructuras dianas para enfoques terapéuticos. Conceptualmente, los enfoques terapéuticos apuntan a una inhibición de la actividad del producto genético asociado a tumor, expresados selectivamente. Esto es práctico en el caso de que una expresión aberrante selectiva, respectiva sea funcionalmente de importancia patogenética tumoral y su supresión va acompañada con un daño selectivo de las células correspondientes. Otros conceptos terapéuticos consideran los antígenos asociados a tumor como marcaciones que reclutan selectivamente mecanismos efectores que tienen potencial dañino para las células tumorales. En este caso, la función de la misma molécula diana y su rol en la generación de tumores es completamente irrelevante.

Por "derivado" de un ácido nucleico se entiende que se presentan sustituciones, supresiones y/o adiciones de nucleótidos, individuales o múltiples, en el ácido nucleico. Además, el término "derivado" también comprende una derivatización química de un ácido nucleico en una base de nucleótido, en azúcar o fosfato de un nucleótido. El término "derivado" también comprende ácidos nucleicos que no contienen nucleótidos y análogos de nucleótidos que se presenten en la naturaleza.

Un ácido nucleico es, por ejemplo, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos comprenden, por ejemplo, ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas de manera recombinante y químicamente sintetizadas. Un ácido nucleico puede presentarse como una molécula monocatenaria o bicatenaria y lineal o circular cerrada de modo covalente.

5 Los ácidos nucleicos descritos pueden estar presentes aislados. La expresión "ácido nucleico aislado" significa de acuerdo con la invención que el ácido nucleico (i) ha sido amplificado *in vitro*, por ejemplo mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), (ii) ha sido producido de modo recombinante mediante clonación, (iii) ha sido purificado, por ejemplo mediante disociación y separación electroforética en gel, o (iv) ha sido sintetizado, por ejemplo mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que está disponible para una manipulación mediante técnicas recombinantes de ADN.

10 Un ácido nucleico es "complementario" a otro ácido nucleico cuando ambas secuencias hibridan entre sí y pueden acompañarse con una molécula dúplex estable, en cuyo caso la hibridación se efectúa preferentemente en condiciones que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones severas). Se describen condiciones severas, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., editores, 2. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., editores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65°C en amortiguador de hibridación (3,5 x SSC, 0,02% Ficoll, 0,02% polivinilpirrolidona, 0,02% albúmina de suero bovino, 2,5 mM NaH₂PO₄ (pH 7), 0,5% SDS, 2 mM EDTA). SSC es una solución con 0,15 M de cloruro de sodio y citrato de sodio, respectivamente, pH 7. Después de la hibridación se lava la membrana a la cual ha sido trasladado el ADN, por ejemplo en 2 x SSC a temperatura ambiente y luego en 0,1 - 0,5 x SSC / 0,1 x SDS a temperaturas hasta 68°C.

20 Ácidos nucleicos complementarios presentan, por ejemplo, al menos 40%, principalmente al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y preferentemente al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de los nucleótidos.

25 Ácidos nucleótidos que codifican antígenos asociados a tumor pueden existir solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, principalmente ácidos nucleicos heterólogos. Un ácido nucleico puede existir funcionalmente en conexión con secuencias de control de expresión o secuencias regulatorias, las cuales pueden ser homólogas o heterólogas con respecto al ácido nucleico. Una secuencia codificante y una secuencia regulatoria se enlazan "funcionalmente" entre sí, si se ligan una con otra de modo covalente de tal manera que la expresión o la transcripción de la secuencia codificante esté bajo el control o la influencia de la secuencia regulatoria. Si la secuencia codificante debe traducirse a una proteína funcional, en el caso de un compuesto funcional de una secuencia regulatoria con la secuencia codificante, una inducción de la secuencia regulatoria conduce a una transcripción de la secuencia codificante sin que se llegue a un desplazamiento del marco de lectura en la secuencia codificante o a una incapacidad de la secuencia codificante para traducirse a la proteína o al péptido deseados.

35 El término "secuencia de control de expresión" o "secuencia regulatoria" comprende promotores, potenciadores y otros elementos de control que regulan la expresión de un gen. La estructura exacta de secuencias regulatorias puede variar dependiendo de la especie y del tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5'-no-transcritas y 5'-no-traducidas, las cuales participan en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente tales como una caja TATA, secuencia de cobertura, secuencia CAAT, y similares. Las secuencias de regulación 5'-no-transcritas comprenden principalmente una región promotora que incluye una secuencia promotora para un control transcripcional del gen enlazado funcionalmente. Las secuencias regulatorias también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras ubicadas en dirección ascendente.

40 En teoría pueden usarse ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a tumor, identificado de acuerdo con la invención para una transfección de células hospederas. Por ácidos nucleicos se entiende en este caso tanto ADN recombinante como también ARN recombinante. ARN recombinante puede producirse por medio de transcripción *in vitro* de una matriz de ADN. Además, ésta puede modificarse antes de la aplicación por medio de secuencias estabilizantes, capping (cobertura) y poliadenilación.

45 El término "célula hospedera" se refiere a cada célula que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término "células hospederas" comprende células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o células eucariotas (por ejemplo, células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células de levaduras y células de insectos) y principalmente también células de mamíferos tales como células de ser humano, ratón, hámster, cerdo, cabro y primates. Las células pueden derivarse de una gran cantidad de tipos de tejido y comprenden células primarias y líneas celulares. Ejemplos específicos comprenden queratinocitos, leucocitos sanguíneos periféricos, células madre de la médula ósea y células madre embrionarias. En otras modalidades, la célula hospedera es una célula que presenta antígeno, principalmente una célula dendrítica, un monocito o macrófago. Un ácido nucleico puede existir en la célula hospedera en una única copia o en varias copias y en una modalidad se expresa en la célula hospedera.

55 El término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN o de proteína. También comprende una expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede efectuarse de manera transitoria o estable. Ejemplos de sistemas de expresión en células de mamíferos comprenden pcDNA3.1 y pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contienen un marcador seleccionable como un gen que confiere

resistencia frente a G418 (y de esta manera habilita una selección de líneas celulares transfectadas de modo estable) y las secuencias de potenciador-promotor de citomegalovirus (CMV).

5 Los kits de acuerdo con la invención comprenden, por ejemplo, un par de cebadores de amplificación que hibridan en el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor. Los cebadores comprenden preferentemente una secuencia de 6-50 principalmente 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico y no se solapan a fin de impedir la formación de cebadores dímeros. Uno de los cebadores se hibridará en una hebra del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor, y el otro cebador se hibridará en la hebra complementaria en una disposición que permita una amplificación del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor.

10 Las moléculas "antisentido" o ácidos nucleicos "antisentido" pueden usarse para la regulación, principalmente la reducción de la expresión de un ácido nucleico. El término "molécula antisentido" o "ácido nucleico antisentido" se refiere a un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado u oligo desoxirribonucleótido modificado y que en condiciones fisiológicas se hibrida en ADN que comprende un gen determinado o en ARNm de este gen, por lo cual se inhibe la transcripción de este gen y/o la traducción de este ARNm. Una "molécula antisentido" comprende también un constructo que contiene un ácido nucleico o una parte del mismo en orientación inversa con respecto a su promotor natural. Un transcripto antisentido de un ácido nucleico o de una parte del mismo puede formar una molécula dúplex con el ARNm de ocurrencia natural que especifica la enzima y de esta manera impedir una acumulación de o la traducción del ARNm a la enzima activa. Otra posibilidad es el uso de ribozimas para desactivar un ácido nucleico. Los oligonucleótidos tienen, por ejemplo, una secuencia de 6-50, en particular 10-30,15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico diana y pueden ser totalmente complementarios al ácido nucleico diana o a una parte del mismo. Los oligonucleótidos antisentido pueden hibridar, por ejemplo, con un sitio en N-terminal o dispuesto en 5'-dirección ascendente, tal como un sitio de iniciación de traducción, sitio de iniciación de transcripción o sitio promotor o con una región 3'- no traducida o un sitio de empalme de ARN.

25 Un oligonucleótido de la invención puede estar compuesto de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o de una combinación de los mismos. En este caso el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido están ligados entre sí mediante un enlace de fosfodiéster. Estos oligonucleótidos pueden sintetizarse de manera convencional o producirse de modo recombinante.

30 De modo alternativo, un oligonucleótido según la invención puede ser un oligonucleótido "modificado". En tal caso, a fin de incrementar su estabilidad, por ejemplo, el oligonucleótido puede modificarse de las maneras más diferentes sin que se afecte su capacidad de enlazarse a su diana. El término "oligonucleótido modificado" significa según la invención un oligonucleótido en el cual (i) al menos dos de sus nucleótidos están ligados entre sí mediante un enlace de internucleósido sintético (es decir un enlace de internucleósido que no es un enlace de fosfodiéster) y/o (ii) un grupo químico, que normalmente no aparece en ácidos nucleicos, se enlaza de modo covalente con el oligonucleótido. Enlaces de internucleósidos sintéticos son fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, ésteres fosfatos, alquilo fosfonotioatos, fosforoamidatos, carbonatos, triésteres fosfatos, acetamidatos, ésteres de carboximetilo y péptidos.

40 El término "oligonucleótido modificado" también comprende oligonucleótidos que tienen un azúcar y/o una base modificada de modo covalente. "Oligonucleótidos modificados" comprenden, por ejemplo, oligonucleótidos con residuos de azúcar que están enlazados de modo covalente a grupos orgánicos de bajo peso molecular que no son un grupo hidroxilo en la posición 3' ni un grupo fosfato en la posición 5'. Los oligonucleótidos modificados pueden comprender, por ejemplo, un residuo de ribosa 2'-O-alquilada u otro azúcar en lugar de ribosa, tal como arabinosa.

45 Las proteínas y polipéptidos descritos según la invención pueden existir aislados. Los términos "proteína aislada" o "polipéptido aislado" significan que la proteína o el polipéptido están separados de su ambiente natural. Una proteína o polipéptido aislados pueden existir en estado esencialmente purificado. El término "esencialmente purificado" significa que la proteína o el polipéptido existen esencialmente libres de otras sustancias con las cuales se presentan en la naturaleza o *in vivo*.

50 Tales proteínas y polipéptidos sirven, por ejemplo, para preparar anticuerpos y son empleables en un ensayo inmunológico o diagnóstico. Las proteínas y los polipéptidos descritos según la invención pueden aislarse de muestras biológicas tales como muestras homogeneizadas de tejidos o de células y también pueden expresarse de modo recombinante en una cantidad de sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

"Derivados" de una proteína o de un polipéptido o de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de supresión de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

55 Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxiterminales, así como inserciones de aminoácidos, individuales o múltiples, en una determinada secuencia de aminoácidos. En el caso de variantes de secuencia de aminoácidos con una inserción se introducen uno o varios residuos de aminoácidos en un sitio

predeterminado en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible una inserción aleatoria con cribado adecuado del producto resultante. Las variantes de supresión de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o de varios aminoácidos de la secuencia las variantes de sustitución de aminoácidos se distinguen porque se elimina al menos un residuo en la secuencia y se inserta otro residuo en su lugar. Las modificaciones se encuentran preferentemente en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas y polipéptidos homólogos. Los aminoácidos se reemplazan preferentemente por otros con propiedades similares tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, electronegatividad, volumen de la cadena lateral, y similares (sustitución conservadora). Las sustituciones conservadoras se refieren, por ejemplo, al intercambio de un aminoácido por otro, en cuyo caso ambos aminoácidos son listados en el mismo grupo que el aminoácido a continuación:

1. Pequeños residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)
2. Residuos cargados negativamente y sus amidas: Asn, Asp, Glu, Gln
3. Residuos cargados positivamente: His, Arg, Lys
4. Grandes residuos alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5. Grandes residuos aromáticos: Phe, Tyr, Trp.

Debido a su papel particular en la arquitectura de la proteína, se ponen tres residuos en paréntesis. Gly es el único residuo sin una cadena lateral y de esta manera confiere flexibilidad a la cadena. Pro posee una geometría peculiar que restringe fuertemente la cadena. Cys puede formar un puente de disulfuro.

"Derivados" de proteínas o polipéptidos también comprenden sustituciones, supresiones y/o adiciones individuales o múltiples de moléculas de cualquier tipo las cuales se asocian con la enzima tal como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o polipéptidos. Además, el término "derivados" también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de las proteínas o de los polipéptidos.

Una parte o fragmento del antígeno asociado a tumor puede tener una propiedad funcional del polipéptido del cual se deriva. Tales propiedades funcionales comprenden la interacción con anticuerpos, la interacción con otros polipéptidos o proteínas, el enlace selectivo de ácidos nucleicos y una actividad enzimática. Una propiedad importante es la capacidad de formar un complejo con HLA y opcionalmente generar una inmuno-reacción. Esta inmuno reacción puede basarse en la estimulación de células T citotóxicas o auxiliares. Una parte o fragmento de un antígeno asociado a tumor comprende, por ejemplo, una secuencia de al menos 6, principalmente de al menos 8, de al menos 10, de al menos 12, de al menos 15, y al menos 20, de al menos 30 o de al menos 50 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor. Una parte o un fragmento de un antígeno asociado a tumor es, por ejemplo, una parte del antígeno asociado a tumor que corresponde a la parte de no- transmembrana, principalmente a la fracción extracelular del antígeno, o que está comprendida por la misma.

Una parte o un fragmento de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor se refieren según la invención a la parte del ácido nucleico que codifica al menos el antígeno asociado a tumor y/o una parte o un fragmento del antígeno asociado a tumor, tal como se definió previamente. De manera preferida, una parte o fragmento de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor es aquella parte que corresponde al marco de lectura abierto, principalmente como se indica en el protocolo de secuencias.

El aislamiento y la identificación de genes que codifican los antígenos asociados a tumor también habilitan el diagnóstico de una enfermedad que se caracteriza por la expresión de uno o de varios antígenos asociados a tumor. Estos métodos comprenden la determinación de uno o de varios ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a tumor, y/o la determinación de los antígenos asociados a tumor codificados y/o de los péptidos derivados de los mismos. Una determinación del ácido nucleico puede efectuarse de manera convencional incluso mediante reacción en cadena de polimerasa o hibridación con una sonda marcada. Una determinación de antígenos asociados a tumor o de péptidos derivados de los mismos puede efectuarse mediante un cribado de antisueros de pacientes con respecto a un reconocimiento del antígeno y/o de los péptidos. También pueden determinarse mediante cribado de células T del paciente para seleccionar especificidad para el correspondiente antígeno asociado a tumor.

Los anticuerpos empleados en el contexto de los métodos y utilidades de la invención pueden reconocer proteínas en estado nativo y/o desnaturalizado (Anderson et al., *J. Immunol.* 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, *J. Immunol. Methods* 234: 107-116, 2000; Kayyem et al., *Eur. J. Biochem.* 208: 1-8, 1992; Spiller et al., *J. Immunol. Methods* 224: 51-60, 1999).

Los antisueros que contienen anticuerpos específicos que se enlazan específicamente a la proteína diana, pueden producirse mediante diferentes métodos estándar; cf. por ejemplo "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" de

Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9, "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142 y "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447. En este caso también es posible generar anticuerpos afines y específicos que reconocen proteínas complejas de membrana en su forma nativa (Azorsa et al., *J. Immunol. Methods* 229: 35-48, 1999; Anderson et al., *J. Immunol.* 143: 1899-] 904, 1989; Gardsvoll, *J. Immunol. Methods.* 234: 107-116, 2000). Esto es de importancia ante todo para la preparación de anticuerpos que se emplean en el marco de aplicaciones diagnósticas. Para este propósito, tanto con la proteína completa, las secuencias parciales extracelulares, como también las células que expresan la molécula diana en su forma plegada fisiológicamente pueden inmunizarse.

Tradicionalmente se producen anticuerpos monoclonales con ayuda de la tecnología de hibridoma (detalles técnicos: véase "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" de Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9; "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142, "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" de Edward Hadow, David Laue, Ed Harlow ISBN: 0879695447).

Se sabe que únicamente una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el paratopo, participa en el enlace del anticuerpo a su epítipo (cf. Clark, W.R. (1986), *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, 1. (1991), *Essential Immunology*, 7. Edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc son, por ejemplo, efectores de la cascada de complemento, aunque no participan en el enlace de antígeno. Un anticuerpo del cual se ha disociado enzimáticamente la región pFc' o el cual se ha producido sin la región pFc', denominada como fragmento de F(ab')₂, lleva ambos sitios de enlace de antígeno de un anticuerpo completo. De manera similar, un anticuerpo del cual se ha disociado enzimáticamente la región Fc o que se ha producido sin la región Fc, denominada como fragmento de Fab, porta un sitio de enlace de antígeno de una molécula intacta de anticuerpo. Además, los fragmentos de Fab se componen de una cadena ligera, enlazada de modo covalente, de un anticuerpo o una parte de la cadena pesada del anticuerpo, denominada como Fd. Los fragmentos Fd son los determinantes principales de la especificidad del anticuerpo (un fragmento único Fd puede asociarse hasta con diez cadenas ligeras diferentes, sin modificar la especificidad del anticuerpo) y en el caso de un aislamiento los fragmentos Fd mantiene la capacidad de enlazar un epítipo.

Dentro de la parte del anticuerpo que enlaza el antígeno se encuentran regiones determinantes de complementariedad (CDRs), que interactúan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones de armazón (FRs), las cuales mantienen la estructura terciaria del paratopo. Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como también en la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG se encuentran cuatro regiones de armazón (FR1 a FR4), las cuales están separadas respectivamente por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR 1 a CDR3). Las CDRs principalmente las regiones CDR3 y aún más particularmente la región CDR3 de la cadena pesada son responsables en gran medida de la especificidad de los anticuerpos.

Se sabe que las regiones que no son CDR de un anticuerpo de mamífero pueden reemplazarse por regiones similares de anticuerpos con la misma especificidad o una distinta, en cuyo caso permanece retenida la especificidad para el epítipo del anticuerpo original. Esto hizo posible el desarrollo de anticuerpos llamados "humanizados", en los cuales CDRs no humanos están enlazados de modo covalente con regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

Esto se usa en la llamada tecnología "SLAM". En este caso, las células B se aíslan de sangre íntegra y las células se hacen monoclonales. A continuación se analizan el sobrenadante de las células B aisladas para su especificidad de anticuerpo. En contraste con la tecnología de hibridoma, a continuación la región variable del gen de anticuerpo se amplifica mediante PCR de célula individual y se clona a un vector adecuado. De esta manera se acelera la obtención de anticuerpos monoclonales (de Wildt et al. *J. Immunol. Methods* 207:61-67, 1997).

Como otro ejemplo, la WO 92/04381 describe la producción y el uso de anticuerpos humanizados RSV de ratón, en los cuales al menos una parte de las regiones FR de ratón han sido reemplazadas por regiones FR de un origen humano. Tales anticuerpos, incluidos fragmentos de anticuerpos intactos con una capacidad de enlazamiento de antígeno con frecuencia se denominan anticuerpos "quiméricos".

De acuerdo con la invención también se proporcionan fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, en los cuales han sido reemplazadas las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o regiones CDR3 de cadena ligera con secuencias homólogas, humanas o no humanas, anticuerpos de fragmento F(ab')₂ quiméricos en los cuales las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o regiones CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmento Fab quiméricos en los cuales las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o regiones CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas o no humanas, y anticuerpos de fragmento Fd quiméricos en los cuales las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 han sido reemplazadas por secuencias homólogas, humanas o no humanas. De acuerdo con la invención, también están comprendidos los llamados anticuerpos de cadena única.

Preferentemente un anticuerpo usado de acuerdo con la invención está dirigido contra una secuencia según SEQ ID NO. 14 del protocolo de secuencias.

En el presente caso también se describen sustancias enlazantes tales como, por ejemplo, polipéptidos los cuales se enlazan específicamente a antígenos asociados a tumor. A manera de ejemplo, tales sustancias de enlace, polipéptidos, pueden prepararse mediante librerías de péptidos degenerados las cuales pueden producirse sencillamente en solución en una forma inmovilizada o como librerías de indicación de fagos. También pueden producirse librerías combinatorias de péptidos con uno o varios aminoácidos. Además, pueden producirse bibliotecas de péptidos y de residuos sintéticos no peptídicos. La indicación (display) de fagos puede ser particularmente efectiva en la identificación de péptidos de enlace según la invención. En este caso se produce, por ejemplo, una librería de fagos (usando por ejemplo el fago m13, fd o lambda) que presenta insertos de una longitud de 4 hasta aproximadamente 80 residuos de aminoácidos. Luego se seleccionan fagos que portan insertos los cuales se enlazan al antígeno asociado a tumor. Este proceso puede repetirse por varios ciclos de una re-selección de fagos que se enlazan al antígeno asociado a tumor. Ronda repetidas conducen a una concentración de fagos que portan determinadas secuencias. Un análisis de secuencias de ADN puede llevarse a cabo a fin de identificar las secuencias de los polipéptidos expresados. Puede determinarse la porción lineal más pequeña de la secuencia que se enlaza al antígeno asociado a tumor. El "sistema dos-híbrido" de levadura también pueden emplearse para la identificación de polipéptidos que se enlazan a un antígeno asociado a tumor. Los antígenos asociados a tumor, descritos de acuerdo con la invención, o los fragmentos de los mismos, pueden emplearse para cribar librerías de péptidos, incluidas librerías de indicación de fagos, con el fin de identificar y seleccionar socios de enlace de péptido de los antígenos asociados a tumor. Tales moléculas pueden usarse, por ejemplo, para ensayos de cribado, protocolos de purificación, para una interferencia con la función del antígeno asociado a tumor y para otros propósitos que son conocidos por el experto en la materia.

Los anticuerpos descritos antes y otras moléculas de enlace pueden usarse, por ejemplo, para la identificación de tejidos que expresan un antígeno asociado a tumor. Los anticuerpos pueden también acoplarse a sustancias específicas de diagnóstico para una representación de células y tejidos que expresan los antígenos asociados a tumor. Además pueden acoplarse a sustancias terapéuticamente útiles. Las sustancias de diagnóstico comprenden, de una manera no limitante, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y materiales de radiodiagnóstico que incluyen emisores de positrones tales como flúor-18 y carbono-11, emisores de rayos gamma tales como yodo-123, tecnecio-99m, yodo-131 e indio-111, nuclidos para resonancia nuclear magnética como flúor y gadolinio.

El término "paciente" significa de acuerdo con la invención una persona humana, un primate no humano u otro animal, principalmente mamífero tal como vaca, caballo, cerdo, oveja, cabrón, perro, gato o roedor tal como ratón y rata. En una modalidad particularmente preferida el paciente es un ser humano.

El término "enfermedad" se refiere de acuerdo con la invención a cada Estado patológico en el cual los antígenos asociados a tumor se expresan o se expresan de manera anormal. "Expresión anormal" significa según la invención que se modifica la expresión frente al estado en el caso de un individuo sano, preferiblemente se incrementa. Un incremento de la expresión se refiere a un incremento en al menos 10%, principalmente al menos 20%, al menos 50% o al menos 100%. En una modalidad, el antígeno asociado a tumor se expresa solamente en tejido de un individuo enfermo, mientras que la expresión se reprime en el caso de un individuo sano. Un ejemplo de una enfermedad así es cáncer, en cuyo caso el término "cáncer" comprende según la invención leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, gliomas, cáncer de intestino, rectal, colorrectal, de estómago, gastrointestinal, de esófago, de oído nariz garganta (ONG), renal, adrenal, de tiroides, de nódulo linfático, de mama, de próstata, uterino, de ovarios, endometrial, de hígado, de páncreas, de piel, de cerebro y de pulmones, y sus metástasis.

Una muestra biológica puede ser según la invención una muestra de tejido y/o de células y puede obtenerse de manera convencional para una utilización en los diferentes métodos aquí descritos, tal como mediante biopsia de tejido, incluida la biopsia por punción toma de sangre, aspirado bronquial, orina, heces u otros fluidos corporales.

Las composiciones farmacéuticas según la invención se administran en general en cantidades farmacéuticamente tolerables y en composiciones farmacéuticamente tolerables. El término "farmacéuticamente tolerable" se refiere a un material no tóxico que no interactúa con el efecto del componente activo de la composición farmacéutica. Tales preparaciones pueden contener habitualmente sales, sustancias amortiguadoras, sustancias conservantes, soportes y opcionalmente otros principios activos terapéuticos. Al utilizarse en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente tolerables. Sales farmacéuticamente no tolerables pueden usarse, no obstante, para la preparación de sales farmacéuticamente tolerables de las mismas y se encuentran comprendidas según la invención. Tales sales farmacológicamente y farmacéuticamente tolerables comprenden, de una manera no limitante, aquellas que se preparan de los siguientes ácidos: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido maleico, ácido acético, ácido salicílico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido malónico, ácido succínico y similares. Sales farmacéuticamente tolerables también pueden prepararse como sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, tales como sales de sodio, de potasio o de calcio.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender vehículo farmacéuticamente compatible. El término "vehículo farmacéuticamente compatible" se refiere según la invención a uno o varios materiales de carga, diluyentes o sustancias de cápsula, compatibles, sólidos o líquidos, que son adecuados para

una administración a una persona. El término "vehículo" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el cual se combina el componente activo a fin de facilitar una aplicación. Los componentes de la composición farmacéutica de la invención son habitualmente de tal forma que no se presente una interacción que perjudique esencialmente la efectividad farmacéutica deseada.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener sustancias amortiguadoras adecuadas tales como ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener opcionalmente sustancias conservantes tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal.

- 10 Las composiciones farmacéuticas se ofrecen habitualmente en una forma posológica uniforme y pueden producirse de una manera conocida per se. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden existir, por ejemplo, en forma de cápsulas, tabletas, pastillas para chupar, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires o como emulsión.

- 15 Las composiciones que son adecuadas para una administración parenteral habitualmente comprenden una preparación estéril, acuosa o no acuosa, del principio activo, la cual es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Los vehículos y solventes compatibles son, por ejemplo, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Adicionalmente se emplean aceites estériles, fijos como medios de solución o de suspensión.

La presente invención se describe detalladamente por medio de las siguientes ilustraciones y los siguientes ejemplos.

Ilustraciones:

Figura 1a, b: análisis qPCR de la expresión específica para LOC90625 en tejidos normales y tumorales.

- 20 1a: análisis cuantitativo de expresión de LOC90625 en tejidos normales (izquierda) y tejidos tumorales (acumulados respectivos de 3-5 pruebas individuales, derecha). Representación lineal de la expresión relativa (activación múltiple).

1b: Representación logarítmica de la expresión en tejidos normales y tumorales.

1c: Análisis de expresión RT-PCR de LOC90625 en A: leucemias (n=14) y B: carcinomas de cabeza/cuello (n=5).

- 25 Fig. 2a: Tintura de transfectantes LOC90625 con anticuerpos específicos. Se han transfectado células con el gen específico como constructor de fusión con eGFP (A) y se han tinturado con un anticuerpo específico contra este producto genético (B). Se detecta especificidad mediante la súperimposición (C) de los tintes usando inmunofluorescencia.

- 30 Fig. 2b: Tintura de transfectantes LOC90625 con anticuerpos específicos en Western Blot. Se transfectaron vestigios 1 & 6: células 293, vestigios 2 & 7: células 293 con LOC90625 y han sido etiquetadas con GFP, vestigios 3,4, 9 & 8: células 293, transfectados solamente con LOC90625.

Fig. 2c: Inmunohistoquímica en cortes de tejidos con anticuerpos LOC90625. Los gametos del testículo son las únicas células normales que expresan este producto genético. Los tumores como el carcinoma de próstata representado a cabo también expresan.

- 35 Ejemplos:

Material y métodos

Los términos "*in silico*" y "electrónicamente" se refieren puramente a la utilización de métodos basados en bases de datos, con los cuales pueden simularse procesos experimentales en laboratorio.

- 40 Todos los otros conceptos y términos son utilizados, si no se definen explícitamente de otra manera, tal como el experto en la materia los entiende. Las técnicas y métodos mencionados se efectúan de una manera conocida per se y están descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos los métodos que incluyen el uso de equipos y reactivos se realizan de conformidad con los datos de los fabricantes.

A. Estrategia con base en minería de datos para la identificación de antígenos asociados a tumor

De acuerdo con la invención se investigaron bases de datos públicas de proteínas y ácidos nucleicos humanos en relación a antígenos específicos de cáncer los cuales son accesibles en la superficie celular. La definición de los criterios de filtro necesarios para esto, junto con una metodología de alto rendimiento para el análisis de todas las proteínas, en lo posible, formaron el componente central de esta estrategia.

5 El punto de partida fue formado por los genes potenciales predichos principalmente a partir del proyecto de genoma humano, los cuales fueron depositados como solamente entradas de proteína ejemplar (XP) o ARNm (XM) en la base de datos "RefSeq" (Pruitt et al., *Trends Genet.* enero;16(1):44-47, 2000) del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI). En otro enfoque, las entradas de proteína validadas (NP) y, respectivamente, los ARNms (NM) de la misma base de datos se analizaron también de la misma manera. Siguiendo el principio fundamental
10 (hipotético) de gen a ARNm a proteína, las proteínas se estudiaron primero para la presencia de dominios de transmembrana combinando una pluralidad de programas de predicción para análisis de proteína. Se analizaron un total de 19 544 entradas de la fracción de XP humana de la base de datos "RefSeq", en cuyo caso 2025 proteínas hipotéticas satisficieron los criterios de filtro. La fracción NP humana proporcionó un total de 19 110 entradas con una proporción de 4 634 proteínas filtradas.

15 El ARNm correspondiente de cada una de estas 2025 o 4634 proteínas se sometió a continuación a una búsqueda de homología en la base de datos EST (Boguski et al., *Nat. Genet.* 4(4):332-333, 1993) del NCBI con ayuda del algoritmo "BLAST" (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997). Los criterios de filtro se establecieron rigurosos en esta búsqueda. En total 1270 ARNms hipotéticos lograron en este caso al menos un acierto en la base de datos EST, y la cantidad de aciertos en casos individuales fue más de 1000.

20 A continuación, se determinó el origen específico para tejido de la librería de ADNc subyacente, así como también el nombre de la librería, para cada uno de estos aciertos válidos. Los tejidos resultantes de esto se dividieron en cuatro grupos diferentes: desde órganos prescindibles (grupo 3) hasta órganos absolutamente esenciales para la vida (grupo 0). Otro grupo, el grupo 4, estaba compuesto de todas las muestras que habían sido obtenidas de tejidos cancerosos. La distribución de aciertos en los cinco grupos se registró en una tabla que se clasificó de acuerdo con
25 la mejor proporción de la suma de los grupos 3 y 4 frente a la suma de los grupos 0-2. En tal caso, aquellos ARNms cuyos aciertos de EST se originaron exclusivamente de tejido canceroso, alcanzaron una posición de punta, seguido de aquellos que también podían encontrarse adicionalmente en tejidos de órganos prescindibles del grupo 3. Otro criterio para la importancia de esta distribución es el número de librerías de ADNc independientes a partir de las cuales se obtuvieron los ESTs y las cuales se muestran en una columna separada de la tabla.

30 Puesto que las transcripciones determinadas en el primer planteamiento y las proteínas correspondientes son primero constructos hipotéticos, se usaron otros criterios de cribado con la intención de probar la existencia real de ARNms y, por consiguiente, también de las proteínas. Para este propósito, cada ARNm fue comparado con el lugar de gen predicho usando el programa "Spidey" (Wheelan et al., *Genome Res.* 11(11):1952-1957, 2001). Solamente aquellas transcripciones que tienen al menos un proceso de empalme, es decir que se extienden por al menos 2
35 exones, fueron usados para análisis más detallados.

La aplicación secuencial de todos los filtros mencionados condujo a los antígenos asociados a tumor de la invención que pueden considerarse accesibles a nivel extracelular debido a un dominio de transmembrana predicho y a la topología relacionada con la misma. El perfil de expresión derivado de los datos de EST indica en todos los casos la expresión específica para el cáncer que puede extenderse a lo sumo a los órganos descartables.

40 B. Estrategia de validación de los antígenos asociados a tumor identificados mediante análisis *in silico*

Para utilizar las dianas para propósitos inmunoterapéuticos (terapias de anticuerpos por medio de anticuerpos monoclonales, vacunación, enfoques terapéuticos mediados por receptor de células T; cf. EP-B-0 879 282) u otros enfoques dirigidos a la diana (compuestos pequeños, ARNsi, etc.) en terapia de cáncer así como también para diagnosticar problemas, la validación de las dianas identificadas según la invención es de importancia central. En
45 este caso, la validación se lleva a cabo mediante análisis de expresión tanto a nivel de ARN como a nivel de la proteína.

1. Examen de la expresión de ARN

La primera caracterización de los antígenos tumorales identificados se efectúa con ayuda de ARN, el cual se obtiene de diferentes tejidos o de líneas celulares específicas para tejido. Debido a que en el patrón de expresión diferencial de tejido sano en comparación con tejido tumoral es de importancia decisiva para la aplicación terapéutica
50 subsiguiente, los genes dianas se caracterizan preferiblemente con la ayuda de estas muestras de tejido.

El aislamiento del ARN total de las muestras de tejido nativo o de las líneas celulares tumorales se efectúa con métodos que son estándar en la biología molecular. Dicho aislamiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, con la ayuda del kit RNeasy Maxi (Qiagen, cat. No. 75162) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método de

aislamiento se basa en el uso de isotiocianato de guanidinio como reactivo caotrópico. De modo alternativo el aislamiento puede realizarse con fenol ácido (Chomczynski & Sacchi, *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987). Después de procesar el tejido por medio de isotiocianato de guanidinio se extrajo ARN con fenol ácido, a continuación se precipitó con isopropanol y se llevó a agua tratada con DEPC.

5 2-4 µg del ARN aislado de esta manera se transcribieron a continuación a ADNc, por ejemplo mediante Superscript II (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La imprimación de la síntesis de ADNc se efectuó en tal caso con ayuda de hexámeros aleatorios (por ejemplo, Roche Diagnostics) de acuerdo con protocolos estándar del fabricante respectivo. Para control de calidad se amplifican los ADNcs con cebadores en 30 ciclos, que son
10 específicos para el gen p53 que se expresa solamente un poco. Solamente sondas de ADNc positivas de p53 se usarán para los otros pasos de reacción.

Para el análisis detallado de la diana se realiza a base de un archivo de ADNc, que había sido aislado de tejidos normales y tumorales así como de líneas tumorales, un análisis de expresión por medio de PCR o de PCR cuantitativo (qPCR). Para este propósito se amplifican 0.5 µl de ADNc de la mezcla de reacción de arriba con una polimerasa de ADN (por ejemplo, 1 U de HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen) de acuerdo con los protocolos del
15 respectivo fabricante (volumen total de la mezcla de reacción: 25-50 µl). Además de la polimerasa, la mezcla de amplificación contiene 0,3 mM dNTPs, amortiguador de reacción (concentración final 1 x, dependiendo del fabricante de la polimerasa de ADN) y cada caso de a 0,3 mM de los cebadores "sentido" y "anti- sentido" específicos para genes.

Los cebadores específicos del gen diana se seleccionan en tanto sea posible de tal manera que se localicen en dos exones diferentes para que las contaminaciones genómica sino conduzcan a resultados falsos positivos. En un PCR de punto final no cuantitativo, el ADNc se incuba normalmente a 95 °C por 15 minutos a fin de desnaturalizar el ADN y de activar la enzima HotStart. A continuación se amplifica el ADN por 35 ciclos (1 minuto a 95 °C, 1 minuto a la temperatura de hibridación específica para el cebador (aproximadamente 55-65 °C), 1 minuto a 72 °C para alargar los amplificados). A continuación se aplican 10 µl de la mezcla de PCR a los geles de agarosa y se separan en el
20 campo eléctrico. El ADN se hace visible en los geles mediante tinción de bromuro de etidio y el resultado de PCR se documenta por medio de una fotografía.

Como alternativa a PCR convencional, la expresión de un gen diana también puede analizarse mediante PCR cuantitativo en tiempo real. Entretanto se encuentran disponibles diversos sistemas analíticos para este análisis, de los cuales los más conocidos son el sistema de detección de secuencia ABI PRISM Sequence detection system (TaqMan, Applied Biosystems), el iCycler (Biorad) así como el Light cycler (Roche Diagnostics). Tal como se ha descrito, una mezcla de PCR específica se somete a una corrida en los instrumentos en tiempo real. Adicionando un tinte de intercalación de ADN (por ejemplo, bromuro de etidio, CybrGreen), el ADN recién sintetizado se hace visible por la excitación de luz específica (de acuerdo con la información del fabricante del tinte). Una multiplicidad de puntos medidos durante la amplificación permite que el proceso entero sea monitoreado y la concentración de ácido nucleico del gen diana sea determinada cuantitativamente. La normalización de la mezcla de PCR se efectúa midiendo un "housekeeping gen" (gen de labor doméstica) (por ejemplo, 18S ARN, β-actina). Estrategias alternativas mediante sondas de ADN etiquetadas con fluorescencia permiten asimismo la determinación cuantitativa del gen diana de una muestra tisular específica (véase aplicaciones TaqMan de la empresa Applied Biosystems).

2. Clonación

40 La clonación de todo el gen diana que se requiere para seguir caracterizando el antígeno tumoral se efectúa de acuerdo con métodos corrientes de biología molecular (por ejemplo, en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience). Para clonar el gen diana o para analizar su secuencia, dicho gen se amplifica primero mediante una polimerasa de ADN que tiene una función de lectura de prueba ("proof reading function") (por ejemplo, pfu, Roche Diagnostics). El amplificado se liga luego a un vector de clonación mediante métodos estándar. Mediante secuencia de análisis se identifican clones positivos y a continuación se caracterizan con ayuda de programas de predicción y algoritmos conocidos.

3. Predicción de la proteína

Muchos de los genes encontrados de acuerdo con la invención (principalmente aquellos del dominio XM de RefSeq) son genes recientemente descubiertos para los cuales el gen de longitud completa debe clonarse, el marco de lectura abierto debe determinarse y la secuencia de la proteína debe deducirse y analizarse.
50

A fin de clonar la secuencia de longitud completa hemos usado protocolos comunes para la rápida amplificación de extremos de ADNc ("Rapid amplification of cDNA ends") y el cribado de librerías de expresión de ADNc con sondas específicas del gen (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Barbor, N.Y.). Después de componer los fragmentos encontrados de esta manera se predijeron marcos de lectura abierta potenciales (ORF por open reading frames) usando programas
55

corrientes de predicción. Puesto que la posición de la cola poliA y de los motivos de poliadenilación predetermina la orientación del producto genético potencial, solamente los 3 marcos de lectura de aquella orientación respectiva permanecen de 6 marcos de lectura posibles. Con frecuencia esto produce solamente un marco de lectura abierto suficientemente grande que puede codificar una proteína, mientras que otros marcos de lectura tienen demasiados codones de parada (stop-codones) y no codificarían una proteína real. En el caso de marcos abiertos de lectura, alternativos, tomar en cuenta los criterios de Kozak para la iniciación de transcripción óptima así como para el análisis de las secuencias de proteína deducidas, potencialmente resultantes, apoya la identificación del ORF auténtico. Éste sigue verificándose generando inmunosueros contra proteínas deducidas de los ORFs potenciales y su análisis para reconocer una proteína real en tejidos y líneas celulares.

4. Producción de anticuerpos

La caracterización de los antígenos asociados a tumor, identificado según la invención, se efectúa, por ejemplo, usando anticuerpos. Además, la invención comprende el uso diagnóstico de anticuerpos. Los anticuerpos pueden reconocer proteínas en el estado nativo y/o desnaturalizado (Anderson et al., *J. Immunol.* 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, *J. Immunol. Methods* 234: 107-116, 2000; Kayyem et al., *Eur. J. Biochem.* 208: 1-8, 1992; Spiller et al., *J. Immunol. Methods* 224: 51-60, 1999).

Los antisueros que comprenden anticuerpos específicos los cuales se enlazan específicamente a la proteína diana, pueden prepararse mediante diversos métodos estándar; cf., por ejemplo, "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" de Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9, "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142 y "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447. También es posible generar anticuerpos afines y específicos que reconocen proteínas de membrana compleja en su forma nativa (Azorsa et al., *J. Immunol. Methods* 229: 35-48, 1999; Anderson et al., *J. Immunol.* 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, *J. Immunol. Methods.* 234: 107-116, 2000). Esto es ante todo de especial importancia en la preparación de anticuerpos que van a usarse terapéuticamente, aunque también para muchas aplicaciones diagnósticas. Para este propósito, tanto la proteína completa como también las secuencias parciales extracelulares pueden usarse para inmunización.

Inmunización y producción de anticuerpos monoclonales

Se han publicado los más diversos protocolos de inmunización. Se inmuniza una especie (por ejemplo, conejos, ratones) mediante una primera inyección de la proteína diana deseada. La respuesta inmune del animal al inmunógeno puede reforzarse mediante una segunda o una tercera inmunización dentro de un período definido de tiempo (aproximadamente 2-4 semanas después de la última inmunización). Una vez más, después de diferentes lapsos de tiempo definidos (el primer sangrado después de 4 semanas, después cada 2-3 semanas, hasta 5 tomas), se toma sangre de dichos animales y se obtiene inmunosuero. Los inmunosueros tomados de esta manera comprenden anticuerpos policlonal es que pueden usarse para detectar y caracterizar la proteína diana en Western Blot, mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.

La inmunización de los animales efectúa por lo regular mediante uno de cuatro métodos bien establecidos, pero también existen otros métodos. La inmunización puede realizarse usando péptidos específicos para la proteína diana, usando la proteína completa, usando secuencias parciales extracelulares de una proteína que puede identificarse experimentalmente o por medio de programas de predicción. Puesto que los programas de predicción no siempre funcionan perfectamente, también es posible emplear dos dominios separados uno de otro por un dominio de transmembrana. En este caso, uno de los dos dominios tiene que ser extracelular, lo cual puede probarse experimentalmente luego (véase más adelante). La inmunización se ofrece comercialmente por diferentes proveedores de servicio.

(1) en el primer caso, se sintetizan péptidos (longitud: 8-12 aminoácidos) mediante métodos in vitro (mediante un servicio comercial en lo posible) y estos péptidos se utilizan para la inmunización. Por lo regular se efectúan 3 inmunizaciones (por ejemplo, con una concentración de 5-100 µg/inmunización).

(2) de modo alternativo, la inmunización puede efectuarse por medio de proteínas recombinantes. Para este propósito, el ADN clonado del gen diana se clona en un vector de expresión y la proteína diana se sintetiza, por ejemplo, libre de células in vitro, en bacterias (por ejemplo, *E. coli*), en levadura (por ejemplo, *S.pombe*) por ejemplo en células de insecto o en células de mamífero, de manera análoga a las condiciones del fabricante respectivo (por ejemplo, Roche Diagnostics, Invitrogen, Clontech, Qiagen). También es posible sintetizar la proteína diana con la ayuda de sistemas de expresión viral (por ejemplo, baculovirus, vacciniavirus, adenovirus). Después de haber sido sintetizada en uno de dichos sistemas, la proteína diana se purifica, normalmente empleando métodos cromatográficos. En este contexto, para la inmunización también es posible usar proteínas que tengan un ancla molecular como una ayuda para purificación (por ejemplo, His-Tag, Qiagen; FLAG-tag, Roche Diagnostics; GST-proteínas de fusión). Puede encontrarse una gran cantidad de protocolos, por ejemplo, en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience. Después de la purificación de la proteína diana, se lleva a cabo una inmunización tal como se ha descrito antes.

(3) Si está disponible una línea celular que sintetiza la proteína deseada de manera endógena, también es posible usar esta línea celular directamente para preparar el antisuero específico. En este caso, la inmunización se lleva a cabo mediante 1-3 inyecciones cada una respectivamente con aproximadamente 1×10^7 células.

5 (4) La inmunización también puede efectuarse por inyección de ADN (inmunización de ADN). Para este propósito, el gen diana primero se clona en un vector de expresión, de modo que la secuencia diana esté bajo el control de un promotor eucariota fuerte (por ejemplo, promotor CMV). A continuación, se transfiere ADN (por ejemplo, 1-10 μg por inyección) como inmunógeno usando un "gene gun" (cañón de genes) a regiones capilares con un flujo sanguíneo fuerte en un organismo (por ejemplo, ratón, conejo). El ADN transferido es asimilado por células del animal, se expresa el gen diana y el animal desarrolla finalmente una respuesta inmune contra la proteína diana (Jung et al., *Mol. Cells* 12: 41-30 49, 2001; Kasinrer et al., *Hybrid Hybridomics* 21: 287-293, 2002).

10

Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales tradicionalmente se producen con ayuda de la tecnología de hibridoma (detalles técnicos, véanse "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" de Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9; "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142, "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" de Edward Harlow, David Lane. Ed Harlow ISBN: 0879695447). También se emplea un nuevo método en la llamada tecnología "SLAM". En este caso, las células B se aíslan de la sangre entera y las células se hacen monoclonales. A continuación, el sobrenadante de las células B aisladas se analiza para su especificidad de anticuerpo. En contraste con la tecnología de hibridoma, la región variable del gen de anticuerpo se amplifica luego mediante PCR de célula individual y se clona en un vector adecuado. De esta manera se acelera la producción de anticuerpos monoclonales (de Wildt et al. *J. Immunol. Methods* 207:61-67, 1997).

15

20

5. Validación de las dianas mediante métodos químicos de proteína usando anticuerpos

Los anticuerpos que pueden producirse tal como se describió antes, pueden usarse para hacer un número de afirmaciones importantes acerca de la proteína diana. En particular, siguientes análisis con prácticos para la validación de la proteína diana:

25 Especificidad del anticuerpo

Con el fin de mostrar que un anticuerpo se enlaza solamente a la proteína diana deseada, los ensayos a base de cultivos celulares con Western Blot a continuación son los más adecuados (diferentes variaciones se describen, por ejemplo, en "Current Protocols in Proteinchemistry", John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience). Para la detección se transfectan células con un ADNc para la proteína diana, la cual está bajo el control de un promotor eucariota fuerte (por ejemplo, promotor de citomegalovirus; CMV). Para transfección de las líneas celulares con ADN, se han establecido bien los más diversos métodos (por ejemplo, electroporación, transfección a base de liposoma, precipitación de fosfato de calcio) (por ejemplo, Lemoine et al., *Methods Mol. Biol.* 75: 441-7, 1997). Como una alternativa, también es posible usar líneas celulares que expresan el gen diana de modo endógeno (detección por medio de RT-PCR específico para el gen diana). Como control, en el caso ideal, los genes homólogos son transfectados conjuntamente en el experimento a fin de poder comprobar en el siguiente Western Blot la especificidad del anticuerpo analizado.

30

35

En el subsiguiente Western Blot las células del cultivo de células o de las muestras tisulares que pueden contener la proteína diana son lisadas en una solución de SDS al 1%, y las proteínas son desnaturizadas en el proceso. Los lisados se separan de acuerdo con el tamaño mediante electroforesis sobre geles de poliacrilamida desnaturizantes al 8-15% (contienen 1% de SDS) (electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida, SDS-PAGE (por sus siglas en inglés)). A continuación las proteínas se transfieren mediante uno de una pluralidad de métodos blotting (por ejemplo, electroblot semiseco; Biorad) a una membrana específica (por ejemplo, nitrocelulosa, Schleicher & Schüll). La proteína deseada puede hacerse visible sobre esta membrana. Para este propósito, la membrana primero se incuba con el anticuerpo que reconoce la proteína diana (dilución aproximada de 1:20-1:200, dependiendo de la especificidad del anticuerpo), durante 60 minutos. Después de un paso de lavado, la membrana se incuba con un segundo anticuerpo que se acopla a un marcador (por ejemplo, enzimas tales como peroxidasa o fosfatasa alcalina) y el cual reconoce el primer anticuerpo. En una reacción de color o quimioluminiscente, la proteína diana puede hacerse visible a continuación sobre la membrana (por ejemplo, ECL, Amersham Bioscience). Un anticuerpo con una alta especificidad por la proteína diana debe reconocer solamente la proteína deseada misma, en el caso ideal.

40

45

50

Localización de la proteína diana

Para confirmar la localización de membrana de la proteína diana, identificada en el enfoque "*in silico*", se utilizan diferentes métodos. Un método importante y bien establecido usando los anticuerpos descritos antes es la inmunofluorescencia (IF). Para este propósito se utilizan células de líneas celulares establecidas que o bien

5 sintetizan la proteína diana (detección del ARN mediante RT-PCR o de la proteína mediante Western Blot), o si no son transfectadas con ADN de plásmido. Para la transfección de líneas celulares con ADN se han establecido los más diversos métodos (por ejemplo, electroporación, transfección a base de liposomas, precipitación de fosfato de calcio) (por ejemplo, Lemoine et al., *Methods Mol. Biol.* 75: 441-7, 1997). El plásmido transfectado a las células en la
 10 inmunofluorescencia puede codificar la proteína no modificada, aunque también acoplar diferentes marcadores de aminoácido a la proteína diana. Los marcadores más importantes son, por ejemplo, la proteína fluorescente "green fluorescent protein" (GFP) en sus diversas formas fluorescentes de modo diferencial, secuencias cortas de péptidos de 6-12 aminoácidos, para las cuales se encuentran disponibles anticuerpos de alta afinidad y específicos, por la
 15 secuencia corta de aminoácidos Cys-Cys-X-X-Cys-Cys, la cual puede enlazar sustancias fluorescentes específicas por medio de sus cisteínas (Invitrogen). Las células que sintetizan la proteína diana se fijan, por ejemplo, con paraformaldehído o metanol. A continuación, las células pueden impermeabilizarse, si se requiere, por incubación con detergentes (por ejemplo, 0,2% Triton X-100). A continuación las células se incuban con un anticuerpo primario el cual está contra la proteína diana contra uno de los marcadores acoplados. Después de un paso de lavado, la
 20 mezcla se incuba con un segundo anticuerpo acoplado a un marcador fluorescente (por ejemplo, fluoresceína, Texas Red, Dako), el cual se enlaza al primer anticuerpo. Las células etiquetadas de esta manera se recubren con glicerina y se analizan con la ayuda de un microscopio de fluorescencia de acuerdo con las indicaciones del fabricante. En este caso se logran emisiones específicas de fluorescencia mediante excitación específica que depende de las sustancias empleadas. El análisis por lo regular permite una localización confiable de la proteína diana, en cuyo caso, para confirmar la calidad de anticuerpo y la proteína diana en tinturados dobles, adicional a la
 25 proteína diana también se tinturan los marcadores acoplados de aminoácidos u otros marcadores cuya localización ya se haya descrito en la bibliografía. Un caso especial representa GFP y sus derivados, los cuales pueden excitarse directamente y dar fluorescencia por sí mismos. La permeabilidad de membrana que puede controlarse mediante el uso de detergentes, en la inmunofluorescencia, permite demostrar si un epítipo inmunogénico está localizado dentro o afuera de la célula. La predicción de las proteínas seleccionadas puede apoyarse experimentalmente de esta
 30 manera. Como alternativa, la detección de dominios extracelulares puede efectuarse mediante citometría de flujo. Para este propósito se fijan células en condiciones no permeabilizantes (por ejemplo, con PBS/azida de Na/2% FCS/5 mM EDTA) y se analizan en el citómetro de flujo según indicaciones del fabricante. Solamente epítopos extracelulares pueden reconocerse por el anticuerpo que va analizarse en este método. A diferencia de la inmunofluorescencia, usando, por ejemplo, yoduro de propidio o azul de tripano, puede distinguirse entre células
 muertas y vivas y de esta manera evitar resultados falsos positivos.

Otra detección importante es mediante inmunohistoquímica (IHC) en muestras tisulares específicas. El objetivo de este método es identificar la localización de una proteína en un agregado tisular funcionalmente intacto. La IHC sirve en particular para (1) poder hacer un estimativo de la cantidad de proteína diana en los tejidos tumorales y normales, (2) para analizar cuantas células se sintetizan en tejidos tumorales y sanos, y (3) definir el tipo de célula en un tejido
 35 (células tumorales, sanas) en el cual es detectable la proteína diana. Como alternativa, pueden cuantificarse las cantidades de proteína de un gen diana mediante inmunofluorescencia de tejido usando una cámara digital y software adecuado (por ejemplo, Tillvision, Till-photonics, Alemania). La tecnología ha sido publicada con frecuencia y, por lo tanto, los detalles de tinte y de microscopía pueden encontrarse, por ejemplo, en "Diagnostic Immunohistochemistry" de David J., MD Dabbs ISBN: 0443065667 o en "Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron Microscopy" ISBN: 0306467704. Debe notarse que, debido a las
 40 propiedades de los anticuerpos, tienen que usarse diferentes protocolos (un ejemplo se describe más adelante) a fin de obtener un resultado con valor informativo.

Por lo regular en la IHC se emplean tejidos tumorales histológicamente definidos y, como referencia, tejidos sanos comparables. Como controles positivos y negativos en este caso también pueden servir líneas celulares en las
 45 cuales se conoce la presencia del gen diana mediante análisis de RT-PCR. Siempre tiene que incluirse un control de fondo.

Piezas tisulares fijadas en formalina (también es posible otro método de fijación, por ejemplo, con metanol) e incrustadas en parafina con un espesor de 4 µm se aplican a un soporte de vidrio y se desparafinan con xileno, por ejemplo. Las muestras se lavan con TBS-T y se bloquean en suero. A continuación la incubación se efectúa con el
 50 primer anticuerpo (dilución: 1:2 a 1:2000) durante 1-18 horas, y normalmente se utilizan anticuerpos purificados por afinidad. Después de un paso de lavado se efectúa una incubación de aproximadamente 30-60 minutos con un segundo anticuerpo el cual está acoplado a una fosfatasa alcalina (alternativa: peroxidasa, por ejemplo) y se dirección a contra el primer anticuerpo. A continuación se efectúa una reacción de color usando fosfatasa alcalina (cf., por ejemplo, Shi et al., *J. Histochem. Cytochem.* 39: 741-748, 1991; Shin et al., *Lab. Invest.* 64: 693-702, 1991).
 55 Para comprobar la especificidad de anticuerpo, la reacción puede bloquearse mediante adición previa del inmunógeno.

Análisis de modificaciones de proteína

Modificaciones secundarias de proteína tales como, por ejemplo, N- y O-glicosilaciones o miristilaciones pueden obstaculizar la accesibilidad de epítopos inmunogénicos o incluso impedirla por completo y de esta manera
 60 cuestionar la efectividad de terapias con anticuerpos. Por otra parte, frecuentemente se ha demostrado que el tipo y

la cantidad de modificaciones secundarias difieren en tejidos normales y tumorales (por ejemplo, Durand & Seta, 2000; Clin. Chern. 46: 795-805; Hakomori, 1996; Cancer Res. 56: 5309-18). El análisis de estas modificaciones es, por lo tanto, es esencial para el éxito terapéutico de un anticuerpo. Los sitios de enlazamiento potencial pueden predecirse por medio de algoritmos específicos.

- 5 El análisis de modificaciones de proteína normalmente se efectúa en Western Blot (véase previamente). Ante todo glicosilaciones que por lo regular tienen un tamaño de varios kDa, conducen a una masa total mayor de la proteína diana, la cual puede separarse en la SDS-PAGE. Para detectar enlaces O- y N- glicosídicos específicos se incuban lisados de proteína antes de la desnaturalización por SDS con O- o N-glicosilasas (según indicaciones del respectivo fabricante, por ejemplo PNGasa, endoglicosidasa F, endoglicosidasa H, Roche Diagnostics). A continuación se efectúa un Western Blot tal como se ha descrito previamente. De esta manera, en caso de una disminución del tamaño de una proteína diana después de la incubación con una glicosidasa, es posible detectar una glicosilación específica y, de esta manera, analizar también la especificidad de tumor de una modificación.

Análisis funcional del gen diana

- 15 La función de la molécula Diana puede ser decisiva para su utilidad terapéutica de modo que los análisis funcionales son un componente importante en la caracterización de moléculas terapéuticamente utilizables. Los análisis funcionales pueden efectuarse en células, en experimentos de cultivos celulares, o bien *in vivo* con ayuda de modelos animales. En este caso, se elimina el gen de la molécula diana mediante mutación ("knockout"), o bien la secuencia diana se inserta en la célula o en el organismo ("knockin"). De esta manera es posible analizar modificaciones funcionales en un contexto celular, por una parte mediante la pérdida de función del gen que se está analizando ("loss of function"). En el segundo caso, pueden analizarse modificaciones causadas por complemento del gen analizado ("gain of function").

a. Análisis funcional en células

- 25 Transfección. A fin de analizar la "gain of function" (adquisición de función), el gen de la molécula diana tiene que transferirse a la célula. Para este propósito son transfectadas con un ADN las células que permiten la síntesis de la molécula diana. Por lo regular, el gen de la molécula diana aquí se encuentra bajo el control de un promotor eucariota fuerte (por ejemplo, promotor de citomegalovirus; CMV). Está bien establecida una amplia variedad de métodos (por ejemplo, electroporación, transfección con base en liposoma, precipitación de fosfato de calcio) para transfectadas líneas celulares con ADN (por ejemplo, Lemoine et al., *Methods Mol. Biol.* 75: 441-7, 1997). El gen puede sintetizarse de manera transitoria, sin integración genómica, o sino establemente con integración genómica después de una selección con neomicina, por ejemplo.

- 35 Interferencia de ARN (ARNsi). Una inhibición de expresión del gen diana, que puede inducir una pérdida completa de función de la molécula diana en las células, puede generarse en las células mediante tecnología de interferencia de ARN (ARNsi) (Hannon, GJ. 2002. RNA interference. *Nature* 418: 244-51; Czauderna et al. 2003. *Nucl. Acid Res.* 31: 670-82). Para este propósito, las células son transfectadas con moléculas cortas de ARN bicatenario de aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud, las cuales son específicas para la molécula diana. Un proceso enzimático da lugar luego a una degradación del ARN específica del gen diana y de esta manera a una expresión reducida de la proteína diana y con esto hace posible que se analice funcionalmente el gen diana.

Ejemplo 1: identificación de LOC90625 como diana diagnóstica y terapéutica de cáncer

- 40 El gen LOC90625 (secuencia de ácido nucleico: SEQ ID NO: 13) es un gen hasta ahora no caracterizado en el cromosoma 21 (21q22.3). Éste codifica una proteína (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 14) con un dominio de transmembrana pero de otra manera sin homologías con proteínas conocidas previamente.

- 45 De acuerdo con la invención, la cantidad de transcripciones específicas del gen en tejido sano y muestras de carcinoma fue investigada después de establecer un RT-PCR específico para LOC90625 (par cebador SEQ ID NO: 15 y 16) (figuras 1a, b, c). LOC90625 se expresa de manera muy selectivamente en tejido sano, las transcripciones específicas son detectables ante todo en el testículo. En todos los otros tejidos sanos analizados, la expresión específica de LOC90625 fue detectable solamente a un nivel bajo, o no fue detectable del todo (figuras 1a, b). De manera sorprendente, hemos detectado sobreexpresión específica de LOC90625 en diferentes tipos de tumor. Principalmente en carcinomas de próstata, de esófago, de cabeza-cuello y de páncreas y en leucemias, LOC90625 estaba fuertemente sobre expresado en comparación con las muestras tisulares sanas respectivas (figuras 1a, b, c).

- 50 LOC90625 es un antígeno expresados selectivamente que obviamente se expresa de manera creciente en tejidos proliferantes. Esta sobreexpresión selectiva en tumores es útil desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico.

El dominio extracelular de LOC90625 puede utilizarse de acuerdo con la invención como estructura diana de anticuerpos monoclonales. Esta estructura pueden ser, por ejemplo, 1-19 (SEQ ID NO: 287) o pueden ser los

aminoácidos 40-160 (SEQ ID NO: 288). Para la producción de anticuerpos específicos de LOC203413 se utilizaron los péptidos según SEQ ID NO: 289 y 290.

5 Nosotros pudimos demostrar que un anticuerpo así es capaz de teñir específicamente células que son transfectadas con el producto genético mencionado y expresan dicho producto (figura 2a). Este anticuerpo también detecta claramente en Western Blot una proteína con el tamaño correcto (figura 2b). Las pinturas inmunohistoquímicas de testículos como controles positivos, aunque también de tumores de próstata (figura 2c) mostraron que este producto genético recientemente encontrado está de hecho traducido a la proteína, lo cual no es detectable en tejidos normales aparte de los testículos, aunque sí en tumores, y las células tumorales de un paciente de hecho se tiñen en la superficie. Por otra parte, estos datos corroboran que este producto genético con su selectividad extraordinaria para células tumorales o de servir como estructura diana para un anticuerpo que puede usarse desde el punto de vista terapéutico y diagnóstico, así como también que en teoría pueden generarse tales anticuerpos contra este producto genético.

10 También son concebibles desde el punto de vista terapéutico otros enfoques orientados a una diana, tales como vacunas y terapias con compuestos pequeños ("small compounds"), los cuales tienen solamente este gen como estructura diana y de esta manera no afectan células sanas. También desde el punto de vista diagnóstico, este gen puede utilizarse gracias a su selectividad por células tumorales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

<120> Identificación de antígenos asociados a superficies para el diagnóstico y terapia de tumores

<130> 342-26PCTEP

5 <150> DE 10 2005 013 846.2

<151> 2005-03-24

<160> 8

<170> Patent In version 3.3

<210> 13

10 <211> 2761

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 537 319 T3

ctaggcctca gtctgtctgc atccagggtgc ttattaaaac agtgtgttgc tccacaccgc 60
 ctctgtgtgt ctggtggcgc gctctccggg ttccaaccaa tgcaagagcc ttggggctgg 120
 ccctgaaacc tgcgaggggc ttccgtccac gtccccagtg gacctaccac ccctccatct 180
 gggaaagcag gccacagcag cgggacaaag gaagctcctc agcctctagt cgctctctg 240
 tgcattgcaca tgggtcactg atctcgccta ctggcacaga cgtgtttatc ggccaaactg 300
 accctcacia aaagctacca ccgaagtggg caggccccta cactgtgata ctcagcacac 360
 caactgcagt gagagtccga ggactcccga actggatcca tgcaccagg gtcaagctca 420
 cccccaaggc agcttcttcc tccaaaacat taacagctaa gtgtttgtct gggccaattt 480
 ctctacciaa gtttaaatta accaacattt ttttcttaa accaaaacac aaggaagact 540
 aaccacgtgc ttccaggaat ggctgtatc taccacaacca ctttctatac ctctcttcca 600
 accaaaagtc ttaatatggg aatatccctc accacgatcc taatactgtc agtagctgtc 660
 ctgctgtcca cagcagcccc tccgagctgc cgtgagtggt atcagtctt gcactacaga 720
 ggggagatgc aacaatactt tacttaccat actcatatag aaagatcctg ttatggaaac 780
 ttaatcgagg aatgtgttga atcaggaaag agttattata aagtaaagaa tctaggagta 840
 tgtggcagtc gtaatggggc tatttgcccc agaggggaagc agtggctttg cttaccaaaa 900
 attggacaat ggggagtaaa cactcaggtg cttgaggaca taaagagaga acagattata 960
 gccaaagcca aagcctcaaa accaacaact cccctgaaa atcgcccgcg gcatttccat 1020
 tcctttatac aaaaactata agcagatgca tcccttccca agccaggaaa aaatctgttt 1080
 gtagatctag gagaaccatt gtgcttacca tgaatgtgtc caattgttgg gtatgcgggg 1140
 gagctttatg agtgaacagt ggctgtggga cgggatagac attccccctt acttacaggc 1200
 atcccaaac ccagactca ctttactcc tcaggaatgc ccgagtcct ggacacttac 1260

ES 2 537 319 T3

caaccagta tgagggacgg tgtgcatatc ccgcaagtgg actgataaaa cccatcgcgc 1320
 cgtaggtgaa aaccctcac caaacctaa cagtcaatgc ctccatagct gagtgggtggc 1380
 caaggttacc ccctggagcc tggctcctt ctaacttaag ctacctcaat tgtgtcttgt 1440
 caaaaaggc ctggtactgt acgaacacca ctaaccctta tgccgcatac ctccgcctaa 1500
 gtgtactatg cgacaatect aggaacacca gctgacaatg gactgccact gacggattcc 1560
 tgtggatatg gggaaaccag gcttactcac agctacotta tcaactggcaa ggtacttgtc 1620
 tcctaggcac aattcaacct ggattctttt tacttccgaa gcaggcgggc aacaccctca 1680
 gagtccctgt gtatgataac cagagaaaaa tgatccttgg aggtaggagg gagccaaaga 1740
 ttgtgagagg acgagtggcc tctgcaacgg atcattgaat actatgggcc tgccacttgg 1800
 gcagaggatg gttcatgggg ttatgcact cccatataata tgccaaatag agcgattaga 1860
 ctacaagctg ttctagagat aatcactaac caaactgect cagccctaga aatgctcgcg 1920
 caacaacaaa accaaatgcg cgcggaatt tatcaaaaca ggctggccct agactactta 1980
 ttagcagaag aggggtgcgg ctgtggtaag ttaacatct ccaattgctg tcttaacata 2040
 ggcaataatg gagaagagg tctggaaatc gcttcaaca tcagaaaagt agcccggtga 2100
 ccagtccaaa cctggggagg atgggaccca gcaaacctc taggaggggtg gttctctaat 2160
 ttaggaggat ttaaaatgct ggtggggaca gtcattttca tcaactgggt cctcctgttt 2220
 ctcccctgtg gtatcccatt aaaactcttg ttgaaactac agttaacctc ctgacaatcc 2280
 agatgatgct cctgctacag cggcacgatg gataccaacc cgtctctcaa gaatacccca 2340
 aaaattaagt ttttctttt ccaaggtgcc cacgccacc ctatgtcacg cctgaagtag 2400
 ttattgagaa agtcgtccct tcccccttt ctataaccaa atagacagga atggaagatt 2460
 ctctcgggg cctgaaagct tgcgggatga ataactctc ctctcaggc ccagtcccaa 2520
 ggtacaaact tgcaccagca gcaagatagc agaggcagga agagagctgg ctggaagaca 2580
 cgtaccccct gaagatcaag agggaggtcg ccctggtact acatagcagt cacgttaggc 2640
 tgggacaatt cctgtttaca gaggactata aaaccctgc cccatcctca cttggggctg 2700
 atgccattht aggcctcagc ctgtctgcat gcaggcgcctc attaaaacag catgttgctc 2760
 c 2761

<210> 14

<211> 160

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 537 319 T3

<400> 14

Met Ala Cys Ile Tyr Pro Thr Thr Phe Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Lys
 1 5 10 15

Ser Leu Asn Met Gly Ile Ser Leu Thr Thr Ile Leu Ile Leu Ser Val
 20 25 30

Ala Val Leu Leu Ser Thr Ala Ala Pro Pro Ser Cys Arg Glu Cys Tyr
 35 40 45

Gln Ser Leu His Tyr Arg Gly Glu Met Gln Gln Tyr Phe Thr Tyr His
 50 55 60

Thr His Ile Glu Arg Ser Cys Tyr Gly Asn Leu Ile Glu Glu Cys Val
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Lys Ser Tyr Tyr Lys Val Lys Asn Leu Gly Val Cys Gly
 85 90 95

Ser Arg Asn Gly Ala Ile Cys Pro Arg Gly Lys Gln Trp Leu Cys Phe
 100 105 110

Thr Lys Ile Gly Gln Trp Gly Val Asn Thr Gln Val Leu Glu Asp Ile
 115 120 125

Lys Arg Glu Gln Ile Ile Ala Lys Ala Lys Ala Ser Lys Pro Thr Thr
 130 135 140

Pro Pro Glu Asn Arg Pro Arg His Phe His Ser Phe Ile Gln Lys Leu
 145 150 155 160

<210> 15

5 <211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

10 <400> 15

cctctagtcg cctctctgtg c

21

<210> 16

<211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 16

5 accctggtgc gatgat

17

<210> 287

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 287

Met Ala Cys Ile Tyr Pro Thr Thr Phe Tyr Thr Ser Leu Pro Thr Lys
1 5 10 15

Ser Leu Asn

<210> 288

<211> 121

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 288

ES 2 537 319 T3

Ala Pro Pro Ser Cys Arg Glu Cys Tyr Gln Ser Leu His Tyr Arg Gly
1 5 10 15
Glu Met Gln Gln Tyr Phe Thr Tyr His Thr His Ile Glu Arg Ser Cys
20 25 30
Tyr Gly Asn Leu Ile Glu Glu Cys Val Glu Ser Gly Lys Ser Tyr Tyr
35 40 45
Lys Val Lys Asn Leu Gly Val Cys Gly Ser Arg Asn Gly Ala Ile Cys
50 55 60
Pro Arg Gly Lys Gln Trp Leu Cys Phe Thr Lys Ile Gly Gln Trp Gly
65 70 75 80
Val Asn Thr Gln Val Leu Glu Asp Ile Lys Arg Glu Gln Ile Ile Ala
85 90 95
Lys Ala Lys Ala Ser Lys Pro Thr Thr Pro Pro Glu Asn Arg Pro Arg
100 105 110
His Phe His Ser Phe Ile Gln Lys Leu
115 120

<210> 289

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 289

Cys Glu Asn Arg Pro Arg His Phe His Ser Phe Ile Gln Lys Leu
1 5 10 15

<210> 290

10 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 290

Cys Ile Tyr Pro Thr Thr Phe Tyr Thr Ser Leu Pro Thr
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico o el control de una enfermedad cancerosa que se caracteriza porque se sobreexpresa un antígeno asociado a tumor en un tejido tumoral, en comparación con un tejido sano comparable, y el método comprende
- 5 (i) la detección de un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor, y/o
- (ii) la detección del antígeno asociado a tumor
- en una muestra biológica aislada de un paciente,
- en cuyo caso el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 13 del protocolo de secuencias, y la enfermedad cancerosa es un carcinoma en el área de cabeza-cuello o una leucemia.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la detección del ácido nucleico se efectúa con una sonda de polinucleótido que se hibrida específicamente con el ácido nucleico o se efectúa mediante amplificación selectiva del ácido nucleico.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la detección del antígeno asociado a tumor se efectúa con un anticuerpo que se enlaza específicamente al antígeno asociado a tumor.
- 15 4. Utilización de un anticuerpo que se enlaza a un antígeno asociado a tumor y se acopla con un medio de diagnóstico para la preparación de una composición farmacéutica para el diagnóstico o el control de una enfermedad cancerosa, y la utilización se caracteriza porque el antígeno asociado a tumor se sobreexpresa en tejido tumoral en comparación con tejido sano comparable, en cuyo caso el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 13 del protocolo de secuencias, y la enfermedad cancerosa es un carcinoma en el área de cabeza-cuello o una leucemia.
- 20 5. Método de acuerdo con la reivindicación 3 o utilización de acuerdo con la reivindicación 4, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado.
6. Método o utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5, donde el antígeno asociado a tumor comprende la secuencia de aminoácidos según SEQ 10 NO: 14 del protocolo de secuencias.
- 25 7. Utilización de un kit para detectar una enfermedad cancerosa que se caracteriza porque se sobreexpresa un antígeno asociado a tumor en tejido tumoral en comparación con tejido sano comparable, en cuyo caso el kit comprende medios para detectar
- (i) el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor, y/o
- 30 (ü) el antígeno asociado a tumor,
- y el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que se codifica por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 13 del protocolo de secuencias, y la enfermedad cancerosa es un carcinoma en el área de cabeza-cuello o una leucemia.
8. Utilización de acuerdo con la reivindicación 7, donde los medios para detectar el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor son moléculas de ácido nucleico para la amplificación selectiva del ácido nucleico.
- 35

Fig. 1a

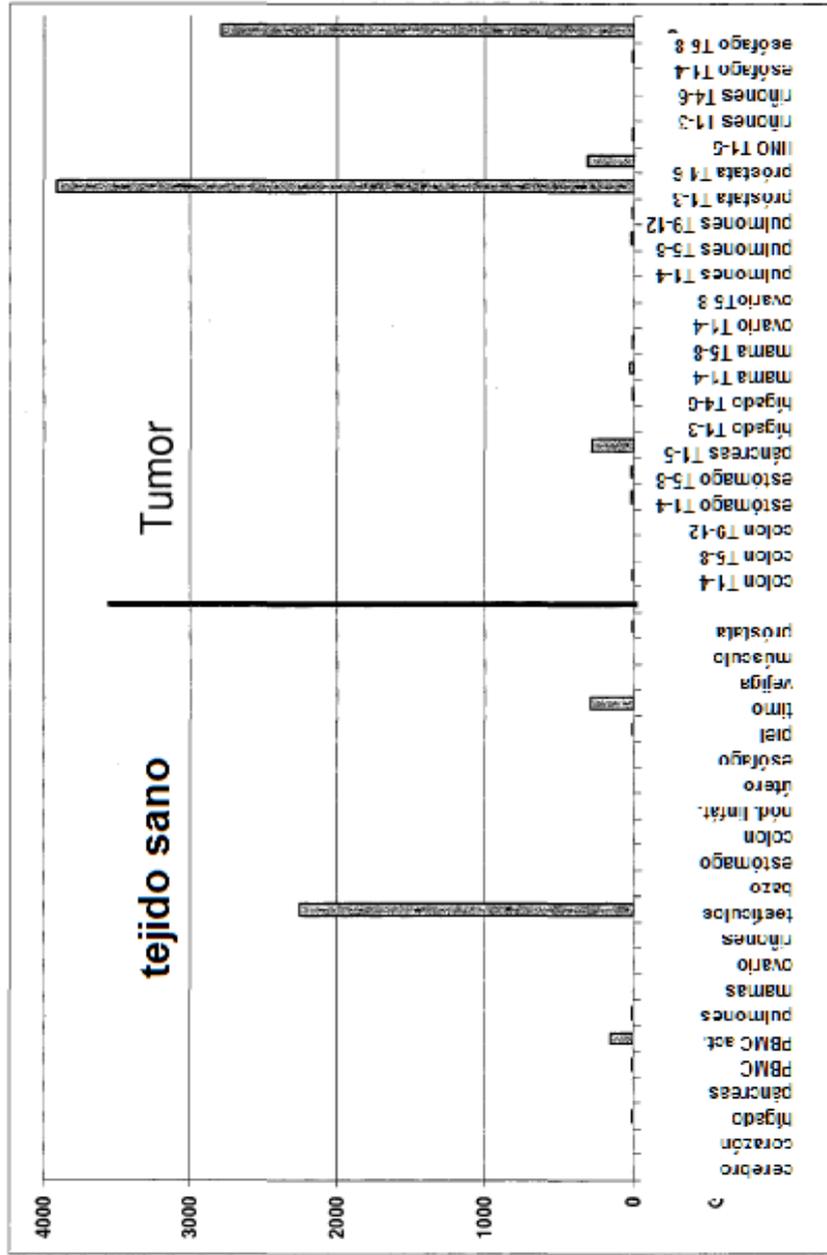
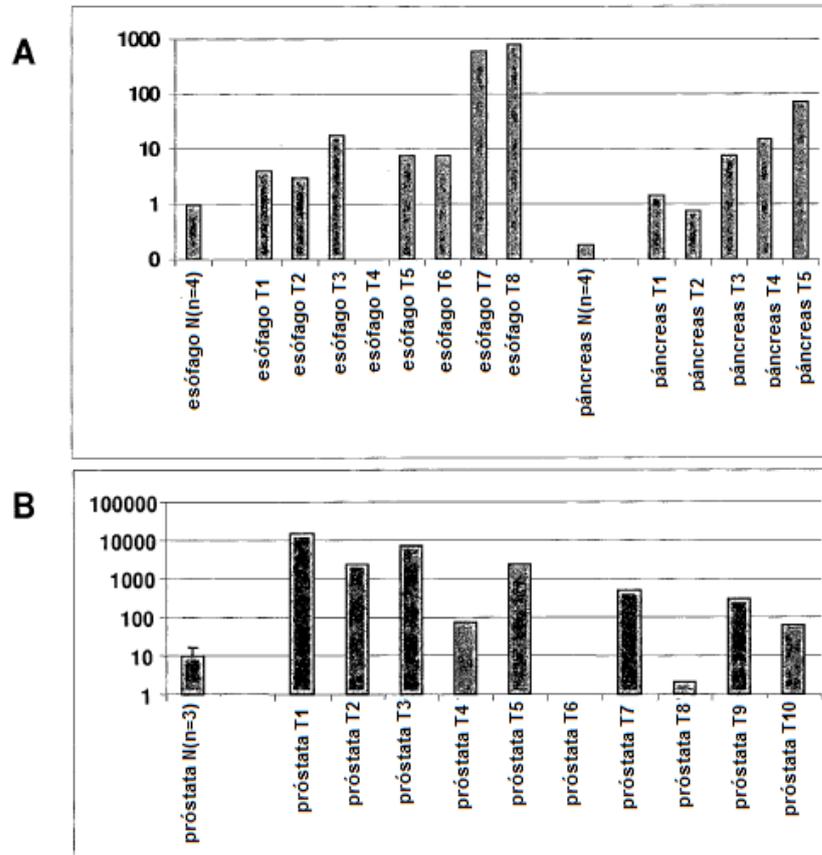


Fig. 1b



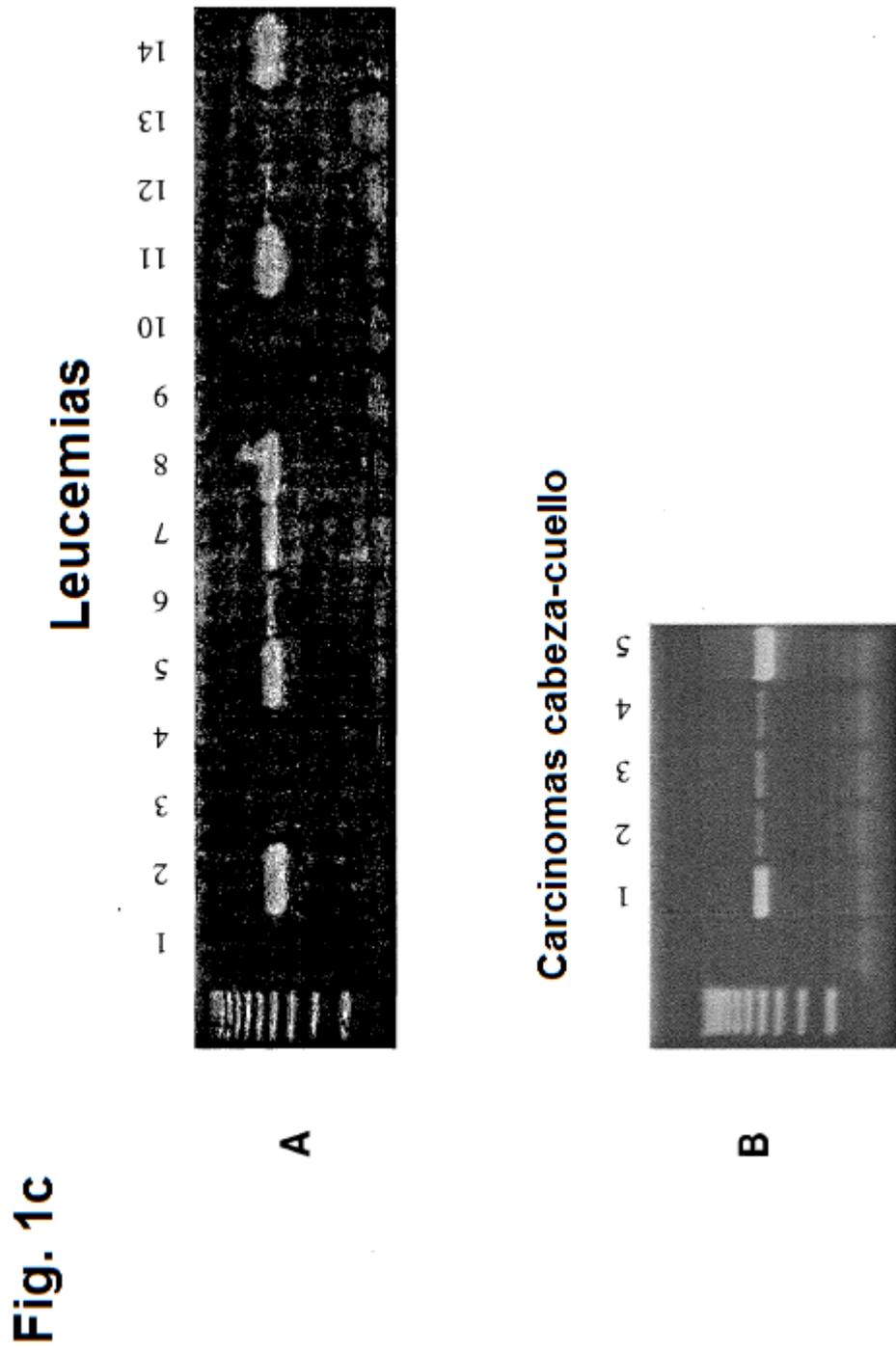


Fig. 2a

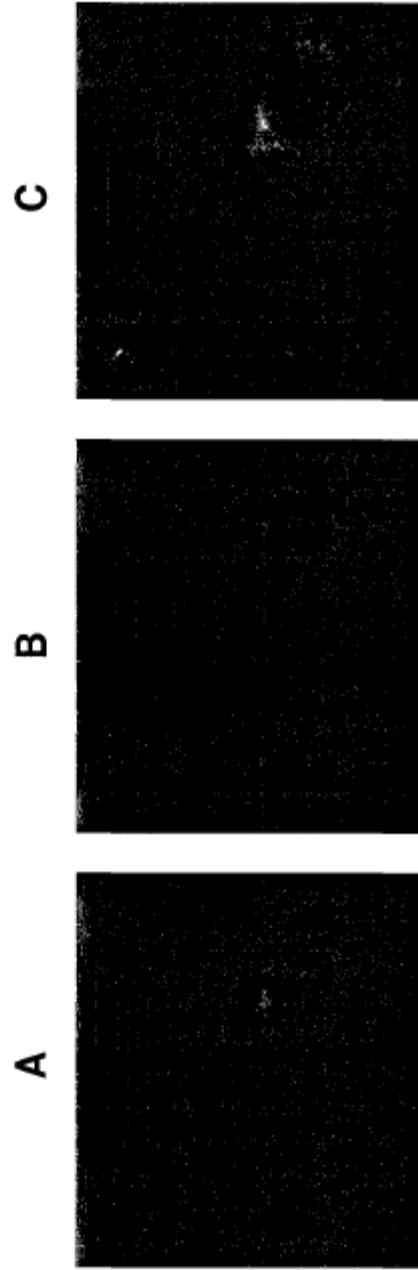
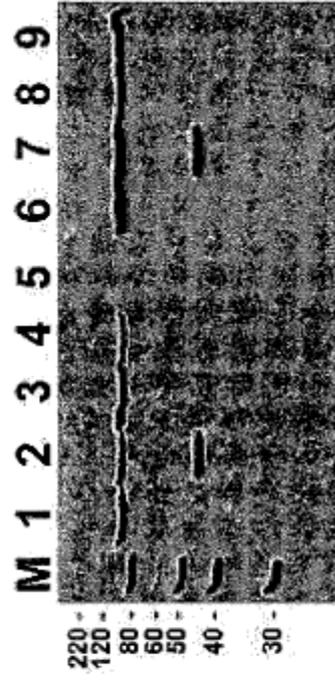


Fig. 2b



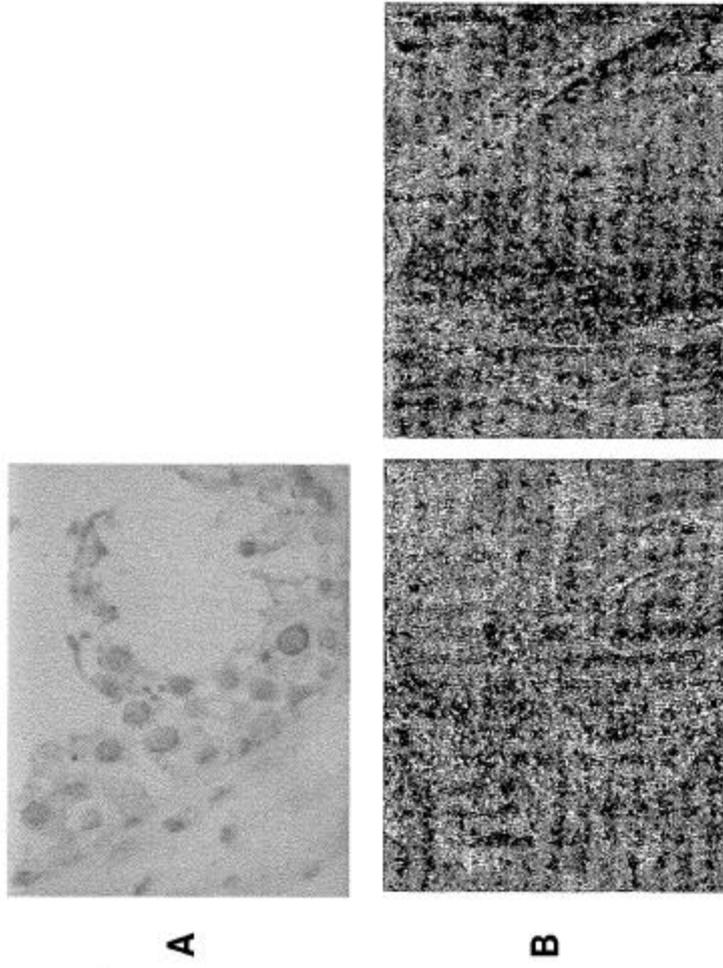


Fig. 2c