

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 754**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2003 E 11007329 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2400018**

54 Título: **Productos génicos expresados de manera diferencial en tumores y utilización de los mismos**

30 Prioridad:

22.11.2002 DE 10254601

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

22.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;
TÜRECI, ÖZLEM y
KOSLOWSKI, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 583 754 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

Productos génicos expresados de manera diferencial en tumores y utilización de los mismos.

5 A pesar de los enfoques interdisciplinarios y de la utilización exhaustiva de las modalidades terapéuticas clásicas, las enfermedades cancerosas se encuentran todavía entre las principales causas de muerte. Los conceptos terapéuticos más recientes tienen como objetivo la incorporación del sistema inmunitario del paciente en el concepto terapéutico global mediante la utilización de vacunas tumorales recombinantes y otras medidas específicas tales como la terapia con anticuerpos. Un requisito previo para el éxito de una estrategia de este tipo es el reconocimiento de antígenos o epítomos específicos de tumores o asociados a tumores por el sistema inmunitario del paciente, cuyas funciones efectoras van a potenciarse de manera intervencionista. Las células tumorales biológicamente difieren sustancialmente de sus células de origen no malignas. Estas diferencias se deben a alteraciones genéticas adquiridas durante el desarrollo tumoral y también dan como resultado, entre otros, la formación de estructuras moleculares alteradas de manera cualitativa o cuantitativa en las células cancerosas. Si las estructuras asociadas a tumores de este tipo se reconocen por el sistema inmunitario específico del huésped que porta el tumor, se habla de antígenos asociados a tumores. En el reconocimiento específico de los antígenos asociados a tumores están implicados mecanismos celulares y humorales, que son dos unidades funcionalmente interconectadas: los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ reconocen los antígenos procesados presentados en las moléculas de las clases II o I del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad = antígenos de histocompatibilidad), mientras que los linfocitos B producen moléculas de anticuerpos circulantes que se unen directamente a antígenos no procesados. La potencial importancia clínico-terapéutica de los antígenos asociados a tumores resulta del hecho de que el reconocimiento de antígenos en células neoplásicas por el sistema inmunitario conduce a la iniciación de mecanismos efectores citotóxicos y, en presencia de células T cooperadoras, puede provocar la eliminación de las células cancerosas (Pardoll, *Nat. Med.* 4: 525-31, 1998). Por consiguiente, un objetivo central de la inmunología tumoral consiste en definir molecularmente estas estructuras. La naturaleza molecular de estos antígenos ha sido enigmática durante mucho tiempo. Sólo tras el desarrollo de técnicas de clonación correspondientes ha sido posible examinar sistemáticamente bibliotecas de expresión de ADNc de tumores para determinar antígenos asociados a tumores mediante el análisis de las estructuras diana de los linfocitos T citotóxicos (CTL) (van der Bruggen *et al.*, *Science* 254: 1643-7, 1991) o utilizando autoanticuerpos circulantes (Sahin *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* 9: 709-16, 1997) como sondas. Para este fin, se prepararon bibliotecas de expresión de ADNc a partir de tejido tumoral reciente y se expresaron de manera recombinante como proteínas en sistemas adecuados. Se utilizaron inmunoelectores aislados de pacientes, concretamente clones de CTL con un patrón de lisis específico de tumores, o autoanticuerpos circulantes, para clonar los respectivos antígenos.

35 En los últimos años, se han definido una pluralidad de antígenos en diversas neoplasias mediante estos enfoques. Sin embargo, los procedimientos clásicos expuestos anteriormente para la identificación de antígenos utilizan inmunoelectores (autoanticuerpos circulantes o clones de CTL) de pacientes con cáncer por regla general ya avanzado como sondas. A partir de una serie de datos se deduce que los tumores pueden conducir, por ejemplo a la tolerización y anergización de células T y que, durante la evolución de la enfermedad, precisamente las especificidades que podrían provocar un reconocimiento inmunitario eficaz se pierden del repertorio inmunoelector. Los estudios con pacientes actuales aún no han producido ninguna prueba sólida de una acción real de los antígenos asociados a tumores hallados y utilizados hasta la fecha. Por consiguiente, no puede descartarse que las proteínas que provocan respuestas inmunitarias espontáneas sean las estructuras diana erróneas.

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

Según la invención, este objetivo se alcanza mediante el objeto de las reivindicaciones.

50 Según la invención, se siguió una estrategia para identificar y proporcionar antígenos expresados en asociación con tumores y los ácidos nucleicos que codifican para los mismos. Esta estrategia se basa en el hecho de que determinados genes, que se expresan de manera específica para órganos, por ejemplo exclusivamente en tejido de colon, pulmón o riñón, se reactivan de manera ectópica y sin permiso en los órganos correspondientes también por las células tumorales y además en otros tejidos en células tumorales. En primer lugar, mediante minería de datos se crea una lista lo más completa posible de todos los genes específicos de órganos conocidos y estos luego se evalúan mediante análisis de expresión por medio de RT-PCR específica para determinar su activación aberrante en diferentes tumores. La minería de datos es un procedimiento conocido de identificación de genes asociados a tumores. Sin embargo, en las estrategias convencionales, por regla general se sustraen electrónicamente los transcriptomas de bibliotecas de tejidos normales de bibliotecas de tejidos tumorales, suponiendo que los genes restantes son específicos de tumor (Schmitt *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27:4251-60, 1999; Vasmataziz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:300-4, 1998; Scheurle *et al.*, *Cancer Res.* 60:4037-43, 2000).

65 Sin embargo, el concepto según la invención, que ha demostrado ser mucho más satisfactorio, se basa en utilizar la minería de datos para extraer electrónicamente todos los genes específicos de órganos y entonces evaluar estos para determinar su expresión en tumores.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una estrategia para identificar genes específicos de tejido y expresados de manera diferencial en tumores. Esta estrategia combina la minería de datos de bibliotecas de secuencias públicas ("*in silico*") con posteriores estudios experimentales de laboratorio de evaluación ("*wet bench*", banco de trabajo para ensayo por vía húmeda).

Una estrategia combinada basada en dos comandos bioinformáticos diferentes permitió según la invención que se identificaran nuevos genes tumorales. Estos se han clasificado hasta la fecha como puramente específicos de órganos. El conocimiento de que estos genes se activan de forma aberrante en las células tumorales, permite que se les asigne una calidad sustancialmente nueva con implicaciones funcionales. La identificación y facilitación de esos genes asociados a tumores y los productos génicos codificados por los mismos tuvo lugar según la invención independientemente de una acción inmunogénica.

Los antígenos asociados a tumores identificados según la divulgación presentan una secuencia de aminoácidos que es codificada por un ácido nucleico, que se selecciona de entre el grupo que consiste en (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 7-8, 117 y 119, una parte o derivado del mismo, (b) un ácido nucleico que en condiciones rigurosas se hibrida con el ácido nucleico de (a), (c) un ácido nucleico que está degenerado con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c). En una forma de realización preferida, un antígeno asociado a tumores identificado según la invención presenta una secuencia de aminoácidos, que es codificada por un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 7-8, 117 y 119. En una forma de realización preferida adicional, un antígeno asociado a tumores identificado según la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 16-19, 111-116, 118, 120 y 137, una parte o derivado del mismo.

La presente invención se refiere en general a la utilización de antígenos asociados a tumores identificados según la divulgación o de anticuerpos que se dirigen contra estos antígenos asociados a tumores para la terapia y el diagnóstico. Esta utilización puede afectar a antígenos individuales, pero también a combinaciones de varios de estos antígenos, fragmentos funcionales, ácidos nucleicos, anticuerpos, etc., en una forma de realización también en combinación con otros antígenos y genes asociados a tumores para un diagnóstico, una terapia y un control de la evolución.

Las enfermedades preferidas para una terapia y/o un diagnóstico son aquellas en las que existe una expresión selectiva o una expresión anómala de uno o varios de los antígenos asociados a tumores identificados según la invención.

La divulgación se refiere también a ácidos nucleicos y productos génicos, que se expresan de manera asociada a células tumorales.

Por lo demás, la invención se refiere a productos génicos, es decir ácidos nucleicos y proteínas o péptidos, que se producen mediante un corte y empalme modificado (variantes de corte y empalme) de genes conocidos o mediante la traducción modificada utilizando marcos de lectura abiertos alternativos. Las variantes de corte y empalme según la invención pueden utilizarse según la invención como dianas para el diagnóstico y la terapia de enfermedades tumorales.

La causa de la producción de variantes de corte y empalme pueden ser los mecanismos más diversos, por ejemplo

- la utilización de sitios de iniciación de la transcripción variables,
- la utilización de exones adicionales,
- el corte y empalme completo o incompleto de exones individuales o varios exones,
- secuencias reguladoras de corte y empalme modificadas mediante mutación (delección o creación de nuevas secuencias donadoras/aceptoras),
- la eliminación incompleta de secuencias intrónicas.

El corte y empalme modificado de un gen conduce a una secuencia del transcrito modificada (variante de corte y empalme). Si se traduce una variante de corte y empalme en la región de su secuencia modificada, se obtiene como resultado una proteína modificada, que puede diferenciarse claramente de la original en su estructura y función. En el caso de variantes de corte y empalme asociadas a tumores pueden producirse transcritos asociados a tumores y proteínas/antígenos asociados a tumores. Estos pueden utilizarse como marcadores moleculares tanto para la detección de células tumorales como para la selección terapéutica como diana de tumores. La detección de células tumorales por ejemplo en sangre, suero, médula ósea, esputo, lavado bronquial, secreciones corporales y biopsias de tejido puede tener lugar según la invención, por ejemplo, tras la extracción de ácidos nucleicos mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de variantes de corte y empalme. Como oligonucleótidos son

adecuados en particular pares de cebadores de los que al menos uno se une en condiciones rigurosas a la región de la variante de corte y empalme, que está asociada a tumor. Según la invención son adecuados los oligonucleótidos descritos para este propósito en los ejemplos, en particular oligonucleótidos que presentan o comprenden una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 39, 40 o 107-110 del protocolo de secuencias. Para la detección son adecuados según la invención todos los sistemas de detección dependientes de secuencia. Además de la PCR estos son, por ejemplo, sistemas de chip génico/microalineamiento, transferencia de tipo Northern, ensayos de protección con ARNasa (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 variantes de corte y empalme. Sin embargo, la detección de células tumorales también puede tener lugar según la invención mediante anticuerpos, que reconocen un epítipo específico codificado por la variante de corte y empalme. Para la producción de los anticuerpos pueden utilizarse péptidos para la inmunización, que son específicos para esta variante de corte y empalme. En este aspecto, la invención se refiere en particular a péptidos, que presentan o comprenden una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 17-19, 111-115, 120 y 137 del protocolo de secuencias y anticuerpos específicos dirigidos contra los mismos. Para la inmunización son adecuados especialmente los aminoácidos que presentan claras diferencias de epítipos con respecto a la variante/las variantes del producto génico, que se forma(n) preferentemente en células sanas. A este respecto, la detección de las células tumorales con anticuerpos puede tener lugar en una muestra aislada del paciente o como formación de imágenes con anticuerpos aplicados por vía intravenosa. Además de la utilidad diagnóstica, las variantes de corte y empalme, que presentan epítipos nuevos o modificados, representan dianas atractivas para la terapia inmunitaria. Los epítipos según la invención pueden utilizarse para seleccionar como diana linfocitos T o anticuerpos monoclonales terapéuticamente eficaces. En este sentido, en la terapia inmunitaria pasiva se transfieren de manera adoptiva anticuerpos o linfocitos T, que reconocen epítipos específicos de variantes de corte y empalme. La generación de anticuerpos puede tener lugar, como en el caso de otros antígenos, también utilizando tecnologías convencionales (inmunización de animales, estrategias de cribado para el aislamiento de anticuerpos recombinantes) utilizando polipéptidos, que contienen estos epítipos. Alternativamente, para la inmunización pueden utilizarse ácidos nucleicos, que codifican para oligo- o polipéptidos, que contienen estos epítipos. Se conocen diferentes técnicas para la generación *in vitro* o *in vivo* de linfocitos T específicos de epítipo y se describen detalladamente (véanse, 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 de las variantes de corte y empalme o ácidos nucleicos, que codifican para los mismos. También pueden utilizarse oligo- o polipéptidos, que contienen los epítipos específicos de las variantes de corte y empalme, o ácidos nucleicos, que codifican para estos polipéptidos, para su utilización como sustancias farmacéuticamente eficaces en la terapia inmunitaria activa (vacunación, terapia con vacuna).

Según la invención se describen también proteínas, que se diferencian en el tipo y la cantidad de sus modificaciones secundarias en tejido normal y tumoral (por ejemplo Durand y Seta, 2000; Clin. Chem. 46: 795-805; Hakomori, 1996; Cancer Res. 56: 5309-18). El análisis de modificaciones de proteínas puede tener lugar en la inmunotransferencia de tipo Western. Sobre todo glicosilaciones, que presentan por regla general un tamaño de varios kDa, conducen a una mayor masa total de la proteína diana, que puede separarse en la SDS-PAGE. Para la detección de enlaces O- y N-glicosídicos específicos se incuban lisados de proteínas antes de la desnaturalización mediante SDS con O- o N-glicosilasas (según las instrucciones del respectivo fabricante, por ejemplo PNGasa, endoglicosidasa F, endoglicosidasa H, Roche Diagnostics). A continuación tiene lugar una inmunotransferencia de tipo Western. En el caso de la reducción del tamaño de una proteína diana puede detectarse entonces tras la incubación con una glicosidasa una glicosilación específica y de este modo también analizarse la especificidad tumoral de una modificación. Son de especial interés las regiones proteicas, que están glicosiladas de manera diferencial en células tumorales y células sanas. Sin embargo, tales diferencias de glicosilación se han descrito hasta la fecha para pocas proteínas de la superficie celular (por ejemplo Muc1).

Según la invención, para claudina-18 pudo detectarse una glicosilación diferencial en tumores. Los carcinomas gastrointestinales, carcinomas de páncreas, tumores de esófago, tumores de próstata así como tumores pulmonares presentan una forma menos glicosilada de claudina-18. La glicosilación en tejidos sanos enmascara epítipos proteicos de claudina-18, que están descubiertos en células tumorales debido a la ausencia de glicosilación. De manera correspondiente, según la invención pueden seleccionarse ligandos y anticuerpos, que se unen a estos dominios. Los ligandos y anticuerpos de este tipo no se unen según la invención a la claudina-18 sobre células sanas, dado que en este caso los epítipos están cubiertos por la glicosilación.

Por consiguiente, de manera similar a la descrita anteriormente para epítipos proteicos derivados de variantes de corte y empalme asociadas a tumores puede utilizarse la glicosilación diferencial para diferenciar células normales y tumorales con intención diagnóstica así como terapéutica.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente que reconoce el antígeno asociado a tumores identificado según la invención y es preferentemente selectivo para células, que presentan una expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores identificado según la invención. El agente puede provocar en determinadas formas de realización la inducción de la muerte celular, la reducción del crecimiento celular, el daño de la membrana celular o la secreción de citocinas y presenta preferentemente una actividad inhibitoria de tumores. En una forma de realización, el agente es un ácido nucleico antisentido, que se hibrida selectivamente con el ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores. En una forma de

realización adicional, el agente es un anticuerpo, que se une selectivamente al antígeno asociado a tumores, en particular un anticuerpo activado por complemento o conjugado con toxina, que se une selectivamente al antígeno asociado a tumores. En una forma de realización adicional, el agente comprende varios agentes, que reconocen en cada caso selectivamente diferentes antígenos asociados a tumores, siendo al menos uno de los antígenos asociados a tumores un antígeno asociado a tumores identificado según la invención. El reconocimiento no tiene que ir acompañado directamente de una inhibición de la actividad o expresión del antígeno. En este aspecto de la invención, el antígeno limitado selectivamente a tumores sirve preferentemente como marca para el reclutamiento de mecanismos efectoros en este sitio específico. En una forma de realización preferida, el agente es un linfocito T citotóxico, que reconoce el antígeno en una molécula de HLA y lisa las células marcadas de esta manera. En una forma de realización adicional, el agente es un anticuerpo que se une selectivamente al antígeno asociado a tumores y por consiguiente recluta mecanismos efectoros naturales o artificiales para esta célula. En una forma de realización adicional, el agente es un linfocito T cooperador, que potencia funciones efectoras de otras células, que reconocen específicamente este antígeno.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la expresión o actividad de un antígeno asociado a tumores identificado según la invención. En una forma de realización preferida, el agente es un ácido nucleico antisentido, que se hibrida selectivamente con el ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores. En una forma de realización adicional, el agente es un anticuerpo que se une selectivamente al antígeno asociado a tumores. En una forma de realización adicional, el agente comprende varios agentes, que en cada caso inhiben selectivamente la expresión o actividad de diferentes antígenos asociados a tumores, siendo al menos uno de los antígenos asociados a tumores un antígeno asociado a tumores identificado según la invención.

Por lo demás la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente, que en el caso de una administración aumenta selectivamente la cantidad de complejos entre una molécula de HLA y un epítipo peptídico del antígeno asociado a tumores identificado según la invención. El agente comprende en una forma de realización uno o varios componentes seleccionados del grupo que consiste en (i) el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, (ii) un ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, (iii) una célula huésped que expresa el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, y (iv) complejos aislados entre epítopos peptídicos del antígeno asociado a tumores y una molécula del CMH. En una forma de realización el agente comprende varios agentes, que aumentan en cada caso selectivamente la cantidad de complejos entre moléculas del CMH y epítopos peptídicos de diferentes antígenos asociados a tumores, siendo al menos uno de los antígenos asociados a tumores un antígeno asociado a tumores identificado según la invención.

Por lo demás la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o varios componentes seleccionados del grupo que consiste en (i) un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o una parte del mismo, (ii) un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o una parte del mismo, (iii) un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o a una parte del mismo, (iv) un ácido nucleico antisentido que se hibrida específicamente con un ácido nucleico, que codifica para un antígeno asociado a tumores identificado según la invención, (v) una célula huésped que expresa un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o una parte del mismo, y (vi) complejos aislados entre un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o una parte del mismo y una molécula de HLA.

Un ácido nucleico, que codifica para un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o una parte del mismo, puede encontrarse en la composición farmacéutica en un vector de expresión y estar asociado funcionalmente con un promotor.

Una célula huésped contenida en una composición farmacéutica según la divulgación puede secretar el antígeno asociado a tumores o la parte del mismo, expresarlo en la superficie o puede expresar adicionalmente una molécula de HLA, que se une al antígeno asociado a tumores o a la parte del mismo. En una forma de realización, la célula huésped expresa la molécula de HLA de manera endógena. En una forma de realización adicional, la célula huésped expresa la molécula de HLA y/o el antígeno asociado a tumores o la parte del mismo de manera recombinante. Preferentemente, la célula huésped no es proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

Un anticuerpo contenido en una composición farmacéutica según la divulgación puede ser un anticuerpo monoclonal. En formas de realización adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, un fragmento de un anticuerpo natural, o un anticuerpo sintético, que pueden producirse todos mediante técnicas combinatorias. El anticuerpo puede estar acoplado con una sustancia o un agente útil desde el punto de vista terapéutico o de diagnóstico.

Un ácido nucleico antisentido contenido en una composición farmacéutica según la divulgación puede comprender una secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores identificado según la invención.

5 En formas de realización adicionales, un antígeno asociado a tumores proporcionado mediante una composición farmacéutica según la divulgación o bien directamente o bien mediante la expresión de un ácido nucleico o una parte del mismo se une a moléculas del CMH en la superficie de células, provocando la unión preferentemente una reacción citolítica y/o induciendo una secreción de citocinas.

10 Una composición farmacéutica según la divulgación puede comprender un portador farmacéuticamente compatible y/o un adyuvante. El adyuvante puede seleccionarse de saponina, GM-CSF, nucleótidos de CpG, ARN, una citocina o una quimiocina. Una composición farmacéutica según la divulgación se utiliza preferentemente para el tratamiento de una enfermedad, que se caracteriza por la expresión selectiva o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores. En una forma de realización preferida la enfermedad es cáncer.

15 Por lo demás se da a conocer un procedimiento para el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad, que se caracteriza por la expresión o expresión anómala de uno o varios antígenos asociados a tumores. En una forma de realización, el tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica.

20 En un aspecto se da a conocer un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad, que se caracteriza por la expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores identificado según la invención. El procedimiento comprende (i) detectar un ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores, o una parte del mismo, y/o (ii) detectar el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, y/o (iii) detectar un anticuerpo contra el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo y/o (iv) detectar linfocitos T cooperadores o citotóxicos, que son específicos para el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, en una muestra biológica aislada de un paciente. En determinadas formas de realización la detección comprende (i) poner en contacto la muestra biológica con un agente, que se une específicamente al ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores, o la parte del mismo, al antígeno asociado a tumores o la parte del mismo, al anticuerpo o a linfocitos T cooperadores o citotóxicos, que son específicos para el antígeno asociado a tumores o partes del mismo, y (ii) detectar la formación de complejo entre el agente y el ácido nucleico o la parte del mismo, el antígeno asociado a tumores o la parte del mismo, el anticuerpo o los linfocitos T cooperadores o citotóxicos. En una forma de realización, la enfermedad se caracteriza por la expresión o expresión anómala de varios antígenos asociados a tumores diferentes y la detección comprende detectar varios ácidos nucleicos, que codifican para los diversos antígenos asociados a tumores diferentes, o partes de los mismos, detectar los diversos antígenos asociados a tumores diferentes o partes de los mismos, detectar varios anticuerpos, que se unen a los diversos antígenos asociados a tumores diferentes o a partes de los mismos, o detectar varios linfocitos T cooperadores o citotóxicos, que son específicos para los diversos antígenos asociados a tumores diferentes. En una forma de realización adicional, la muestra biológica aislada del paciente se compara con una muestra biológica normal comparable.

40 En un aspecto adicional, se da a conocer un procedimiento para determinar la regresión, la evolución o la aparición de una enfermedad, que se caracteriza por la expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores identificado según la invención, que comprende la monitorización de una muestra de un paciente que presenta la enfermedad o del que se sospecha que puede padecer la enfermedad, con respecto a uno o varios parámetros seleccionados del grupo que consiste en (i) la cantidad del ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores, o una parte del mismo, (ii) la cantidad del antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, (iii) la cantidad de anticuerpos, que se unen al antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, y (iv) la cantidad de células T citolíticas o células T cooperadoras, que son específicas para un complejo entre el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo y una molécula del CMH. Preferentemente, el procedimiento comprende determinar el o los parámetros en un primer momento en una primera muestra y en un segundo momento en una muestra adicional, determinándose mediante una comparación de ambas muestras la evolución de la enfermedad. En determinadas formas de realización, la enfermedad se caracteriza por la expresión o expresión anómala de varios antígenos asociados a tumores diferentes y la monitorización comprende una monitorización de (i) la cantidad de varios ácidos nucleicos, que codifican para los diversos antígenos asociados a tumores diferentes, o de partes de los mismos, y/o (ii) la cantidad de los diversos antígenos asociados a tumores diferentes o de partes de los mismos y/o (iii) la cantidad de varios anticuerpos, que se unen a los diversos antígenos asociados a tumores diferentes o a partes de los mismos, y/o (iv) la cantidad de varias células T citolíticas o células T cooperadoras, que son específicas para complejos entre los diversos antígenos asociados a tumores diferentes o de partes de los mismos y moléculas del CMH.

50 Una detección de un ácido nucleico o de una parte del mismo o una monitorización de la cantidad de un ácido nucleico o de una parte del mismo puede tener lugar con una sonda polinucleotídica, que se hibrida específicamente con el ácido nucleico o la parte del mismo, o puede tener lugar mediante la amplificación selectiva del ácido nucleico o de la parte del mismo. En una forma de realización, la sonda polinucleotídica comprende una secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 ó 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico.

65 En determinadas formas de realización, el antígeno asociado a tumores que debe detectarse o la parte del mismo está presente de manera intracelular o sobre la superficie celular. Una detección de un antígeno asociado a tumores o de una parte del mismo, o una monitorización de la cantidad de un antígeno asociado a tumores o de una parte del mismo puede tener lugar según la invención con un anticuerpo, que se une específicamente al antígeno asociado a

tumores o a la parte del mismo.

En formas de realización adicionales, el antígeno asociado a tumores que debe detectarse o la parte del mismo está presente en un complejo con una molécula del CMH, en particular una molécula de HLA.

5 Una detección de un anticuerpo o la monitorización de la cantidad de anticuerpos puede tener lugar con una proteína o péptido, que se une específicamente al anticuerpo.

10 Una detección de células T citolíticas o células T cooperadoras o la monitorización de la cantidad de células T citolíticas o células T cooperadoras, que son específicas para complejos entre un antígeno o una parte del mismo y moléculas del CMH, puede tener lugar según la invención con una célula, que presenta el complejo entre el antígeno o la parte del mismo y una molécula del CMH.

15 La sonda polinucleotídica utilizada para una detección o para una monitorización, el anticuerpo, la proteína o péptido o la célula están, por ejemplo, marcados de manera detectable. En determinadas formas de realización el marcador detectable es un marcador radiactivo o un marcador enzimático. La detección de linfocitos T puede tener lugar adicionalmente mediante la detección de su proliferación, su producción de citocinas, así como su actividad citotóxica, que se desencadena mediante la estimulación específica con el complejo del CMH y antígeno asociado a tumores o partes del mismo. La detección de linfocitos T puede tener lugar además mediante una molécula del CMH recombinante o también un complejo de varias moléculas del CMH, que están cargadas con el respectivo fragmento inmunogénico de uno o varios de los antígenos asociados a tumores y mediante la puesta en contacto del receptor de células T específico, con lo que pueden identificarse linfocitos T específicos.

20 En un aspecto adicional se da a conocer un procedimiento para el tratamiento, el diagnóstico o la monitorización de una enfermedad, que se caracteriza por la expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores identificado según la invención, que comprende la administración de un anticuerpo, que se une al antígeno asociado a tumores o una parte del mismo y está acoplado con una sustancia o agente terapéutico o de diagnóstico. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En formas de realización adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de un anticuerpo natural.

25 La divulgación se refiere también a un procedimiento para el tratamiento de un paciente con una enfermedad, que se caracteriza por la expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores identificado según la invención, que comprende (i) tomar una muestra con células inmunorreactivas del paciente, (ii) poner en contacto la muestra con una célula huésped, que expresa el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, en condiciones que favorecen una producción de células T citolíticas frente al antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, y (iii) introducir las células T citolíticas en el paciente en una cantidad, que es adecuada para lisar células que expresan el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo. La divulgación se refiere igualmente a la clonación del receptor de células T de células T citolíticas frente al antígeno asociado a tumores. Este puede transferirse a otras células T, que de ese modo obtienen la especificidad deseada y pueden introducirse en el paciente tal como en el punto (iii).

30 En una forma de realización, la célula huésped expresa una molécula de HLA de manera endógena. En una forma de realización adicional, la célula huésped expresa una molécula de HLA y/o el antígeno asociado a tumores o la parte del mismo de manera recombinante. Preferentemente, la célula huésped no es proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

35 En un aspecto adicional se da a conocer un procedimiento para el tratamiento de un paciente con una enfermedad, que se caracteriza por la expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores, que comprende (i) la identificación de un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumores identificado según la invención, expresado por células que están asociadas con la enfermedad, (ii) la transfección de una célula huésped con el ácido nucleico o una parte del mismo, (iii) el cultivo de la célula huésped transfectada para una expresión del ácido nucleico (esto no es obligatorio en el caso de alcanzar una tasa de transfección elevada), y (iv) la introducción de las células huésped o de un extracto de las mismas en el paciente en una cantidad, que es adecuada para aumentar la reacción inmunitaria contra las células del paciente, que están asociadas con la enfermedad. El procedimiento puede comprender además la identificación de una molécula del CMH, que presenta el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, expresando la célula huésped la molécula del CMH identificada y presentando el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo. La reacción inmunitaria puede comprender una reacción de células B o una reacción de células T. Por lo demás, una reacción de células T puede comprender la producción de células T citolíticas y/o células T cooperadoras, que son específicas para las células huésped, que presentan el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo o son específicas para células del paciente, que expresan el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo.

40 La divulgación se refiere también a un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad, que se caracteriza por la expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores identificado según la invención, que comprende (i) la identificación de células del paciente, que expresan cantidades anómalas del antígeno asociado a

tumores, (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, que es adecuada para desencadenar una reacción inmunitaria contra las células.

5 Preferentemente, las células huésped utilizadas según la divulgación no son proliferativas o se vuelven no proliferativas. Una enfermedad, que se caracteriza por la expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores, es en particular cáncer.

10 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a secuencias promotoras de ácidos nucleicos según la invención. Estas pueden asociarse funcionalmente con otro gen preferentemente en un vector de expresión y por consiguiente garantizar la expresión selectiva de este gen en células correspondientes.

15 En un aspecto adicional se da a conocer una molécula de ácido nucleico recombinante, en particular una molécula de ADN o ARN, que comprende un ácido nucleico según la divulgación.

La divulgación se refiere también a células huésped que contienen un ácido nucleico según la divulgación o una molécula de ácido nucleico recombinante, que comprende un ácido nucleico según la divulgación.

20 La célula huésped puede comprender además un ácido nucleico, que codifica para una molécula de HLA. En una forma de realización, la célula huésped expresa la molécula de HLA de manera endógena. En una forma de realización adicional, la célula huésped expresa la molécula de HLA y/o el ácido nucleico según la divulgación o una parte del mismo de manera recombinante. Preferentemente, la célula huésped no es proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

25 En una forma de realización adicional, la divulgación se refiere a oligonucleótidos, que se hibridan con un ácido nucleico identificado según la divulgación y pueden utilizarse como sondas genéticas o como moléculas "antisentido". Moléculas de ácido nucleico en forma de cebadores oligonucleotídicos o muestras competentes, que se hibridan con un ácido nucleico identificado según la invención o partes del mismo, pueden utilizarse para encontrar ácidos nucleicos, que son homólogos al ácido nucleico identificado según la invención. Pueden utilizarse amplificación por PCR, hibridación de tipo Southern y Northern para encontrar ácidos nucleicos homólogos. La hibridación puede tener lugar en condiciones poco rigurosas, mejor de rigurosidad media y lo mejor en condiciones muy rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones según la invención, que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos.

35 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un fragmento inmunogénico de un antígeno asociado a tumores identificado. El fragmento se une preferentemente a un receptor de HLA humano o anticuerpo humano. Preferentemente, un fragmento comprende una secuencia de al menos 6, en particular al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 aminoácidos.

40 En este aspecto la divulgación se refiere en particular a un péptido, que presenta o comprende una secuencia, seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 17-19, 111-116, 120 y 137, una parte o derivado del mismo.

45 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un agente que se une a un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o a una parte del mismo. En una forma de realización preferida, el agente es un anticuerpo. En formas de realización adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo quimérico, humanizado o producido con técnicas combinatorias. Por lo demás, se da a conocer un anticuerpo, que se une de manera selectiva a un complejo de (i) un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o una parte del mismo y (ii) una molécula del CMH, a la que se une el antígeno asociado a tumores identificado según la invención o la parte del mismo, no uniéndose el anticuerpo solo a (i) o (ii). Un anticuerpo según la invención puede ser un anticuerpo monoclonal. En formas de realización adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de un anticuerpo natural.

55 En particular, la invención se refiere a un agente de este tipo, en particular un anticuerpo, que se une específicamente a un péptido, que presenta o comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 17-19, 111-116, 120 y 137, una parte o derivado del mismo.

60 Por lo demás, la invención se refiere a un conjugado entre un agente según la invención, que se une a un antígeno asociado a tumores identificado según la invención o a una parte del mismo, o un anticuerpo según la invención y una sustancia o agente terapéutico o de diagnóstico. En una forma de realización, el agente terapéutico o de diagnóstico es una toxina.

65 En un aspecto adicional se da a conocer un kit para detectar la expresión o expresión anómala de un antígeno asociado a tumores identificado según la invención, que comprende agentes para detectar (i) el ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores, o una parte del mismo, (ii) el antígeno asociado a tumores o una parte

del mismo, (iii) anticuerpos, que se unen al antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, y/o (iv) células T, que son específicas de un complejo entre el antígeno asociado a tumores o una parte del mismo y una molécula del CMH. En una forma de realización, los agentes para detectar el ácido nucleico o la parte del mismo son moléculas de ácido nucleico para la amplificación selectiva del ácido nucleico, que comprenden en particular una secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 ó 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención

Según la invención se describen genes, que se expresan de manera selectiva o se expresan de manera aberrante en células tumorales y representan un antígeno asociado a tumores.

Según la invención, estos genes y/o sus productos génicos y/o sus derivados y/o partes son estructuras diana preferidas para enfoques terapéuticos. Conceptualmente, los enfoques terapéuticos pueden tener como objetivo una inhibición de la actividad del producto génico asociado a tumores expresado de manera selectiva. Esto es útil cuando la expresión aberrante o selectiva es funcionalmente importante desde el punto de vista de la patogénesis tumoral y su supresión va acompañada de un daño selectivo de las células correspondientes. Otros conceptos terapéuticos consideran antígenos asociados a tumores como marcas, que reclutan mecanismos efectores con potencial de daño celular de manera selectiva para células tumorales. En este sentido, la función de la propia molécula diana y su papel en la aparición del tumor es totalmente insignificante.

Con "derivado" de un ácido nucleico quiere decirse según la invención que están presentes sustituciones, deleciones y/o adiciones de nucleótidos individuales o múltiples en el ácido nucleico. Además, el término "derivado" comprende también una derivatización química de un ácido nucleico en una base de nucleótido, en el azúcar o en el fosfato. El término "derivado" comprende también ácidos nucleicos, que contienen nucleótidos y análogos de nucleótidos que no se producen de manera natural.

Un ácido nucleico es según la invención preferentemente un ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos comprenden según la invención ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas de manera recombinante y sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede estar presente según la invención como molécula monocatenaria o bicatenaria y lineal o cerrada covalentemente de manera circular.

Los ácidos nucleicos descritos según la invención están preferentemente aislados. El término "ácido nucleico aislado" significa según la invención que el ácido nucleico (i) se amplificó *in vitro*, por ejemplo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) se produjo de manera recombinante mediante clonación, (iii) se purificó, por ejemplo mediante escisión y separación mediante electroforesis en gel o (iv) se sintetizó, por ejemplo mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico, que está disponible para una manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

Entonces, un ácido nucleico es "complementario" a otro ácido nucleico, cuando las dos secuencias se hibridan una con otra y pueden formar un dúplex estable, teniendo lugar la hibridación preferentemente en condiciones que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones rigurosas). Las condiciones rigurosas se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, Ed., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, Ed., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y hacen referencia por ejemplo a la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina sérica bovina al 0,02%, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7. Tras la hibridación se lava la membrana, a la que se transfirió el ADN, por ejemplo en 2 x SSC a temperatura ambiente y después en 0,1 - 0,5 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68°C.

Los ácidos nucleicos complementarios presentan según la invención una identidad de los nucleótidos de al menos el 40%, en particular al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y preferentemente al menos el 95%, al menos el 98 o al menos el 99%.

Los ácidos nucleicos, que codifican para antígenos asociados a tumores, pueden estar presentes según la invención solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, en particular ácidos nucleicos heterólogos. En formas de realización preferidas, un ácido nucleico está presente unido funcionalmente con secuencias de control de expresión o secuencias reguladoras, que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto al ácido nucleico. Una secuencia codificante y una secuencia reguladora están entonces unidas "funcionalmente" entre sí, si están enlazadas covalentemente entre sí de tal manera que la expresión o transcripción de la secuencia codificante está bajo el control o bajo la influencia de la secuencia reguladora. En caso de que la secuencia codificante deba traducirse a una proteína funcional, en el caso de una unión funcional de una secuencia reguladora con la secuencia codificante, una inducción de la secuencia reguladora conduce a una transcripción de la secuencia codificante, sin que se produzca un desplazamiento del marco de lectura en la secuencia codificante o una incapacidad de la secuencia codificante de traducirse a la proteína o péptido deseado.

El término "secuencia de control de expresión" o "secuencia reguladora" comprende según la invención promotores,

- potenciadores y otros elementos de control, que controlan la expresión de un gen. En determinadas formas de realización según la invención, las secuencias de control de expresión son regulables. La estructura exacta de secuencias reguladoras puede variar en función de la especie o en función del tipo celular, pero comprende en general secuencias no transcritas en 5' y no traducidas en 5', que participan en la iniciación de la transcripción o traducción, como caja TATA, secuencia de ocupación de extremos, secuencia CAAT y similares. En particular, las secuencias de regulación no transcritas en 5' comprenden una región promotora, que incluye una secuencia promotora para un control transcripcional del gen unido funcionalmente. Las secuencias reguladoras también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en el sentido de 5'.
- 5 Por tanto, por un lado, los antígenos asociados a tumores expuestos en este caso pueden combinarse con cualquier secuencia de control de expresión y promotor. Sin embargo, por otro lado, según la invención los promotores de los productos génicos asociados a tumores expuestos en este caso pueden combinarse con cualquier otro gen. Esto permite aprovechar la actividad selectiva de estos promotores.
- 10 Por lo demás, un ácido nucleico puede estar presente según la invención en unión con otro ácido nucleico, que codifica para un polipéptido, que controla una secreción de la proteína o polipéptido codificado por el ácido nucleico a partir de una célula huésped. Un ácido nucleico también puede estar presente según la invención en unión con otro ácido nucleico, que codifica para un polipéptido, que provoca un anclaje de la proteína o polipéptido codificado sobre la membrana celular de la célula huésped o su compartimentalización en determinados orgánulos de esta célula. Del mismo modo puede tener lugar una unión con un ácido nucleico, que representa un gen indicador o cualquier "etiqueta".
- 15 En una forma de realización preferida, una molécula de ADN recombinante es según la invención un vector, dado el caso con un promotor, que controla la expresión de un ácido nucleico, por ejemplo de un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumores según la invención. A este respecto, el término "vector" se utiliza en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico, que por ejemplo permite integrar el ácido nucleico en células procariotas y/o en células eucariotas y dado el caso integrarlo en un genoma. Tales vectores se replican y/o se expresan preferentemente en la célula. Un vehículo intermediario puede estar adaptado, por ejemplo, para la utilización en la electroporación, en el bombardeo con microproyectiles, en la administración liposómica, en la transferencia con ayuda de agrobacterias o en la inserción a través de virus de ADN o ARN. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos o genomas virales.
- 20 Los ácidos nucleicos, que codifican para un antígeno asociado a tumores identificado según la invención, pueden utilizarse para una transfección de células huésped. A este respecto, por ácido nucleico quiere decirse tanto ADN recombinante como ARN. Puede producirse ARN recombinante mediante la transcripción *in vitro* de una matriz de ADN. Por lo demás puede modificarse antes de la aplicación mediante secuencias estabilizadoras, ocupación de extremos y poliadenilación.
- 25 El término "célula huésped" se refiere según la invención a cualquier célula, que puede transformarse con o a la que puede transfectarse un ácido nucleico exógeno. El término "células huésped" comprende según la invención procariotas (por ejemplo *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células de levadura y células de insecto). Se prefieren especialmente células de mamífero tales como células de ser humano, ratón, hámster, cerdo, cabra, primates. Las células pueden derivarse de un gran número de tipos de tejidos y comprenden líneas celulares y células primarias. Los ejemplos específicos comprenden queratinocitos, leucocitos sanguíneos periféricos, células madre de la médula ósea y células madre embrionarias. En formas de realización adicionales, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula huésped en una única o en varias copias y se expresa en una forma de realización en la célula huésped.
- 30 El término "expresión" se utiliza según la invención en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína. También comprende una expresión parcial de ácidos nucleicos. Por lo demás, la expresión puede tener lugar de manera transitoria o estable. Los sistemas de expresión preferidos en células de mamífero comprenden pcDNA3.1 y pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contienen un marcador selectivo tal como un gen, que confiere resistencia frente a G418 (y por consiguiente posibilita una selección de líneas celulares transfectadas de manera estable) y las secuencias potenciadoras-promotoras de citomegalovirus (CMV).
- 35 En los casos de la invención, en los que una molécula de HLA presenta un antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, un vector de expresión también puede comprender una secuencia de ácido nucleico, que codifica para la molécula de HLA. La secuencia de ácido nucleico, que codifica para la molécula de HLA, puede estar presente en el mismo vector de expresión que el ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores o la parte del mismo, o ambos ácidos nucleicos pueden estar presentes en diferentes vectores de expresión. En el último caso, ambos vectores de expresión pueden cotransfectarse en una célula. En el caso de que una célula huésped no exprese ni el antígeno asociado a tumores o la parte del mismo ni la molécula de HLA, ambos ácidos nucleicos que codifican para ello se transfectan o bien en el mismo vector de expresión o bien en diferentes vectores de expresión en la célula. En el caso de que la célula ya exprese la molécula de HLA, puede transfectarse solo la secuencia de ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores o la parte del mismo, en la célula.
- 40
45
50
55
60
65

También se dan a conocer kits para la amplificación de un ácido nucleico, que codifica para un antígeno asociado a tumores. Tales kits comprenden, por ejemplo, un par de cebadores de amplificación, que se hibridan al ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores. Los cebadores comprenden preferentemente una

5 secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 ó 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico y no son solapantes, para evitar la formación de dímeros de cebadores. Uno de los cebadores se hibridará a una cadena del ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores, y el otro cebador se hibridará a la cadena complementaria en una disposición que permite una amplificación del ácido nucleico, que codifica para el antígeno asociado a tumores.

10 Pueden utilizarse moléculas "antisentido" o ácidos nucleicos "antisentido" para regular, en particular reducir la expresión de un ácido nucleico. El término "molécula antisentido" o "ácido nucleico antisentido" se refiere según la divulgación a un oligonucleótido, que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado o oligodesoxirribonucleótido modificado y que en condiciones fisiológicas se hibrida a ADN, que

15 comprende un determinado gen, o ARNm de este gen, con lo que se inhibe la transcripción de este gen y/o la traducción de este ARNm. Una "molécula antisentido" comprende según la divulgación también un constructo, que contiene un ácido nucleico o una parte del mismo en una orientación inversa con respecto a su promotor natural. Un transcrito antisentido de un ácido nucleico o de una parte del mismo puede formar un dúplex con el ARNm que se produce de manera natural, que especifica la enzima, e impedir así una acumulación de o la traducción del ARNm en la enzima activa. Una posibilidad adicional es la utilización de ribozimas para la inactivación de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos antisentido preferidos presentan una secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 ó 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico diana y preferentemente son completamente complementarios al ácido nucleico diana o una parte del mismo.

25 En formas de realización preferidas, el oligonucleótido antisentido se hibrida con un sitio N-terminal o en sentido de 5', tal como un sitio de iniciación de la traducción, de iniciación de la transcripción o de promotor. En formas de realización adicionales, el oligonucleótido antisentido se hibrida con una región no traducida en 3' o un sitio de corte y empalme de ARNm.

30 En una forma de realización, un oligonucleótido está compuesto por ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o una combinación de los mismos. A este respecto, el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido están enlazados entre sí mediante un enlace fosfodiéster. Estos oligonucleótidos pueden sintetizarse de manera convencional o producirse de manera recombinante.

35 En formas de realización preferidas, un oligonucleótido es un oligonucleótido "modificado". A este respecto, el oligonucleótido, para aumentar por ejemplo su estabilidad o eficacia terapéutica, puede estar modificado de las maneras más diversas sin que su capacidad de unirse a su diana se vea perjudicada. El término "oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido en el que (i) al menos dos de sus nucleótidos están enlazados entre sí mediante un enlace internucleosídico sintético (es decir un enlace internucleosídico, que no es un enlace fosfodiéster) y/o (ii) un grupo químico está unido covalentemente con el oligonucleótido, que normalmente no aparece en el caso de los ácidos nucleicos. Enlaces internucleosídicos sintéticos preferidos son fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, ésteres de fosfato, alquilfosfonotioatos, fosforoamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidatos, ésteres carboximetílicos y péptidos.

40 El término "oligonucleótido modificado" comprende también oligonucleótidos con un azúcar y/o una base modificada covalentemente. Los "oligonucleótidos modificados" comprenden por ejemplo oligonucleótidos con restos de azúcar, que están unidos covalentemente a grupos orgánicos con un peso molecular reducido, 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 resto ribosa 2'-O-alquilado u otro azúcar en lugar de ribosa tal como arabinosa.

50 Las proteínas y polipéptidos descritos según la invención están preferentemente de manera aislada. Los términos "proteína aislada" o "polipéptido aislado" significan que la proteína o polipéptido está separado de su entorno natural. Una proteína o polipéptido aislado puede estar presente en un estado esencialmente purificado. El término "esencialmente purificado" significa que la proteína o polipéptido está esencialmente libre de otras sustancias, con las que está presente en la naturaleza o *in vivo*.

55 Tales proteínas y polipéptidos sirven, por ejemplo, para producir anticuerpos y pueden utilizarse en un ensayo inmunológico o de diagnóstico o como productos terapéuticos. Las proteínas y polipéptidos descritos según la invención pueden aislarse de muestras biológicas tales como homogeneizados tisulares o celulares y también pueden expresarse de manera recombinante en un gran número de sistemas de expresión pro- o eucariotas.

60 Los "derivados" de una proteína o polipéptido o de una secuencia de aminoácidos en el sentido de esta invención comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

65 Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxiterminales, así como inserciones

de aminoácidos individuales o múltiples aminoácidos en una determina secuencia de aminoácidos. En las variantes de secuencia de aminoácidos con una inserción se introducen uno o varios restos de aminoácido en un sitio predeterminado de una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible una inserción aleatoria con examen adecuado del producto resultante. Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o varios aminoácidos de la secuencia. Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por que al menos un resto se elimina de la secuencia y otro resto se inserta en su sitio. Preferentemente, las modificaciones se encuentran en posiciones en la secuencia de aminoácidos, que no están conservadas entre proteínas o polipéptidos homólogos. Preferentemente se reemplazan aminoácidos por otros con propiedades similares, tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, electronegatividad, volumen de la cadena lateral y similares (sustitución conservativa). Las sustituciones conservativas hacen referencia, por ejemplo, al intercambio de un aminoácido por otro aminoácido expuesto a continuación en el mismo grupo que el aminoácido sustituido:

1. pequeños restos alifáticos, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)
2. restos cargados negativamente y sus amidas: Asn, Asp, Glu, Gln
3. restos cargados positivamente: His, Arg, Lys
4. grandes restos alifáticos, apolares: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5. grandes restos aromáticos: Phe, Tyr, Trp.

Tres restos se ponen entre paréntesis debido a su papel particular para la arquitectura proteica. Gly es el único resto sin una cadena lateral y por consiguiente confiere flexibilidad a la cadena. Pro presenta una geometría poco frecuente, que limita enormemente la cadena. Cys puede formar un puente disulfuro.

Las variantes de aminoácido descritas anteriormente pueden producirse fácilmente con ayuda de técnicas de síntesis de péptidos conocidas, como por ejemplo mediante "síntesis en fase sólida" (Merrifield, 1964) y procedimientos similares o mediante manipulación de ADN recombinante. Las técnicas para introducir mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN, que presenta una secuencia conocida o parcialmente conocida, se conocen ampliamente y comprenden por ejemplo mutagénesis de M13. La manipulación de secuencias de ADN para la producción de proteínas con sustituciones, inserciones o delecciones se describe detalladamente, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989).

Los "derivados" de proteínas, polipéptidos o péptidos comprenden también sustituciones, delecciones y/o adiciones individuales o múltiples de cualquier molécula que esté asociada con la enzima, tal como hidratos de carbono, lípidos y/o proteínas, polipéptidos o péptidos. Además, el término "derivado" se extiende también a todos los equivalentes químicos funcionales de las proteínas, polipéptidos o péptidos.

Una parte o fragmento de un antígeno asociado a tumores presenta según la divulgación una propiedad funcional del polipéptido, del que se deriva. Tales propiedades funcionales comprenden la interacción con anticuerpos, la interacción con otros polipéptidos o proteínas, la unión selectiva de ácidos nucleicos y una actividad enzimática. Una propiedad significativa es la capacidad de formar un complejo con HLA y dado el caso generar una reacción inmunitaria. Esta reacción inmunitaria puede basarse en la estimulación de células T cooperadoras o citotóxicas. Preferentemente, una parte o fragmento según la invención de un antígeno asociado a tumores comprende una secuencia de al menos 6, en particular al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumores.

Una parte o un fragmento de un ácido nucleico, que codifica para un antígeno asociado a tumores, se refiere a la parte del ácido nucleico, que al menos codifica para el antígeno asociado a tumores y/o codifica para una parte o un fragmento del antígeno asociado a tumores tal como se definió anteriormente.

El aislamiento y la identificación de genes, que codifican para antígenos asociados a tumores, también posibilita el diagnóstico de una enfermedad, que se caracteriza por la expresión de uno o varios antígenos asociados a tumores. Estos procedimientos comprenden la determinación de uno o varios ácidos nucleicos, que codifican para un antígeno asociado a tumores, y/o la determinación de los antígenos asociados a tumores codificados y/o de péptidos derivados de los mismos. Una determinación del ácido nucleico puede tener lugar de manera convencional, incluyendo mediante la reacción en cadena de la polimerasa o hibridación con una sonda marcada. Una determinación de antígenos asociados a tumores o péptidos derivados de los mismos puede tener lugar mediante un examen de antiseros de pacientes con respecto a un reconocimiento del antígeno y/o de los péptidos. También puede tener lugar mediante un examen de células T del paciente para determinar la especificidad para el antígeno asociado a tumores correspondiente.

La presente divulgación permite también el aislamiento de proteínas, que se unen a antígenos asociados a tumores descritos en la presente memoria, incluyendo anticuerpos y parejas de unión celulares de los antígenos asociados a tumores.

Según la invención se proporcionan también en determinadas formas de realización polipéptidos “dominantemente negativos”, que se derivan de antígenos asociados a tumores. Un polipéptido dominantemente negativo es una variante inactiva de una proteína, que mediante la interacción con la maquinaria celular impide la interacción de una proteína activa con la maquinaria celular o compite con la proteína activa, mediante lo cual se reduce la acción de la proteína activa. Por ejemplo, un receptor dominantemente negativo, que se une a un ligando, pero no genera ninguna señal en respuesta a la unión del ligando, puede reducir la acción biológica del ligando. De manera similar, una cinasa catalíticamente inactiva dominantemente negativa, que interacciona normalmente con proteínas diana, pero no fosforila las proteínas diana, puede reducir la fosforilación de las proteínas diana en respuesta a una señal celular. De manera similar, un factor de transcripción dominantemente negativo, que se une a un sitio de promotor en la región de control de un gen, pero no aumenta la transcripción del gen, puede reducir la acción de un factor de transcripción normal mediante la ocupación de sitios de unión a promotor sin un aumento de la transcripción.

El resultado de la expresión de un polipéptido dominantemente negativo en una célula es una reducción de la función de proteínas activas. El experto en la materia puede producir variantes dominantemente negativas de una proteína por ejemplo mediante procedimientos de mutagénesis convencionales y la evaluación de la acción dominantemente negativa del polipéptido de la variante.

Según la invención también están comprendidas sustancias tales como polipéptidos, que se unen a antígenos asociados a tumores. Tales sustancias de unión pueden utilizarse por ejemplo en ensayos de examen para detectar antígenos asociados a tumores y complejos de antígenos asociados a tumores con sus parejas de unión así como en una purificación de los antígenos asociados a tumores y de complejos de los mismos con sus parejas de unión. Tales sustancias pueden utilizarse también para inhibir la actividad de antígenos asociados a tumores por ejemplo mediante la unión a tales antígenos.

Por tanto, según la invención están comprendidas sustancias de unión como por ejemplo anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, que presentan la capacidad de unirse selectivamente a antígenos asociados a tumores. Los anticuerpos comprenden anticuerpos policlonales y monoclonales, que se producen de manera convencional.

Tales anticuerpos pueden reconocer proteínas en un 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 contiene anticuerpos específicos, que se unen específicamente a la proteína diana, pueden producirse a través de diferentes procedimientos convencionales; véanse 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. A este respecto, también es posible generar anticuerpos afines y específicos, que reconocen proteínas de membrana complejas 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 importante sobre todo para la producción de anticuerpos, que se pretende que se utilicen terapéuticamente, pero también para muchas aplicaciones de diagnóstico. Para ello puede realizarse una inmunización tanto con toda la proteína, con secuencias parciales extracelulares, como con células que expresan la molécula diana en una forma plegada fisiológicamente.

Los anticuerpos monoclonales se producen tradicionalmente con ayuda de la tecnología del hibridoma (para datos 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 Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447).

Se sabe que sólo una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el parátipo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase Clark, W.R (1986), *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991), *Essential Immunology*, 7ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc son por ejemplo efectores de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión a antígeno. Un anticuerpo, del que se escindió enzimáticamente la región pFc' o que se produjo sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')₂, porta ambos sitios de unión a antígeno de un anticuerpo completo. De manera similar, un anticuerpo, del que se escindió enzimáticamente la región Fc o que se produjo sin la región Fc, denominado fragmento Fab, porta un sitio de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Por lo demás, los fragmentos Fab están compuestos por una cadena ligera unida covalentemente de un anticuerpo y una parte de la cadena pesada del anticuerpo, denominada Fd. Los fragmentos Fd son los determinantes principales de la especificidad de anticuerpo (un único fragmento Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes, sin modificar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan, en caso de aislamiento, la capacidad de unirse a un epítipo.

Dentro de la parte de unión a antígeno de un anticuerpo se encuentran regiones determinantes de complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones de entramado

(FR), que mantienen la estructura terciaria del parátipo. Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como en la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG se encuentran cuatro regiones de entramado (FR1 a FR4), que están separadas en cada caso por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR y en particular las regiones CDR3 y todavía más las regiones CDR3 de la cadena pesada son responsables en gran medida de la especificidad del anticuerpo.

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 especificidad diferente, manteniéndose la especificidad para el epítipo del anticuerpo original. Esto hizo posible el desarrollo de denominados anticuerpos "humanizados", en los que las CDR no humanas están unidas covalentemente con regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para la producción de un anticuerpo funcional.

Esto lo aprovecha la denominada tecnología "SLAM". En este sentido, se aíslan células B de sangre completa y se convierten las células en monoclonales. A continuación se analiza el residuo de la célula B aislada para determinar su especificidad de anticuerpo. A diferencia de la tecnología del hibridoma, a continuación se amplifica la región variable del gen de anticuerpo mediante una PCR de células individuales y se clona en 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, el documento WO 92/04381 describe la producción y utilización de anticuerpos anti-VRS humanizados de ratón, en los que al menos una parte de las regiones FR de ratón se reemplazaron por regiones FR de origen humano. Tales anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos intactos con una capacidad de unión a antígeno se denominan a menudo anticuerpos "quiméricos".

Según la invención se proporcionan también fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se reemplazaron por secuencias humanas o no humanas homólogas, anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos, en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se reemplazaron por secuencias humanas o no humanas homólogas, anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos, en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se reemplazaron por secuencias humanas o no humanas homólogas, y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos, en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se reemplazaron por secuencias humanas o no humanas homólogas. Según la invención también están comprendidos los denominados anticuerpos de cadena sencilla.

Según la invención también están comprendidos polipéptidos, que se unen específicamente a antígenos asociados a tumores. Por ejemplo, tales sustancias de unión polipeptídicas pueden proporcionarse mediante bibliotecas de péptidos degeneradas, que pueden proporcionarse fácilmente en disolución en forma inmovilizada o pueden producirse como bibliotecas de exposición en fago. Igualmente pueden producirse bibliotecas combinatorias de péptidos con uno o varios aminoácidos. Además pueden producirse bibliotecas de peptoides y restos sintéticos no peptídicos.

La exposición en fago puede ser especialmente eficaz en la identificación de péptidos de unión según la invención. A este respecto se produce por ejemplo una biblioteca de fagos (mediante la utilización por ejemplo del fago m13, fd o lambda), que presenta insertos de desde 4 hasta aproximadamente 80 restos de aminoácido de longitud. Después se seleccionan fagos, que portan insertos, que se unen al antígeno asociado a tumores. Este proceso puede repetirse a lo largo de varios ciclos de una nueva selección de fagos, que se unen al antígeno asociado a tumores. Rondas repetidas conducen a un enriquecimiento de fagos, que portan determinadas secuencias. Puede tener lugar un análisis de secuencias de ADN, para identificar las secuencias de los polipéptidos expresados. Puede determinarse la parte lineal más pequeña de la secuencia, que se une al antígeno asociado a tumores. El "sistema de dos híbridos" de levadura también puede utilizarse para la identificación de polipéptidos, que se unen a un antígeno asociado a tumores. Pueden utilizarse antígenos asociados a tumores o fragmentos de los mismos descritos según la invención para examinar bibliotecas de péptidos, incluyendo bibliotecas de exposición en fago, para identificar y seleccionar parejas de unión peptídicas de los antígenos asociados a tumores. Tales moléculas pueden utilizarse, por ejemplo, para ensayos de examen, protocolos de purificación, para una interferencia con la función del antígeno asociado a tumores y para otros fines conocidos por el experto en la materia.

Los anticuerpos descritos anteriormente y otras moléculas de unión pueden utilizarse, por ejemplo, para la identificación de tejido que expresa un antígeno asociado a tumores. Los anticuerpos también pueden acoplarse a sustancias de diagnóstico específicas para una representación de células y tejidos, que expresan antígenos asociados a tumores. Además pueden acoplarse a sustancias terapéuticamente útiles. Las sustancias de diagnóstico comprenden de manera no limitativa sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y agentes de radiodiagnóstico, incluyendo emisores de positrones tales como flúor-18 y carbono-11, emisores gamma tales como yodo-123, tecnecio-99m, yodo-131 e indio-111, nucleidos para resonancia magnética nuclear tales como flúor y gadolinio. El término "sustancia terapéuticamente útil" quiere decir según la invención cualquier molécula terapéutica, que se conduce de manera deseable selectivamente a una célula, que expresa uno o varios antígenos asociados a tumores, incluyendo agentes anticancerígenos, compuestos dotados de yodo radiactivo, toxinas,

fármacos citostáticos o citolíticos, etc. Los agentes anticancerígenos comprenden, por ejemplo, aminoglucetimidina, azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfano, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabidina, dacarbazina, dactinomomicina, daunorubina, doxorubicina, taxol, etopósido, fluoruracilo, interferón- α , lomustina, mercaptopurina, metotrexato, mitotano, procarbazona-HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina. Agentes anticancerígenos adicionales se describen, por ejemplo, en Goodman y Gilman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 8ª edición, 1990, McGraw-Hill, Inc., en particular capítulo 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner). Las toxinas pueden ser proteínas tales como proteína antiviral de hierba carmín, toxina del cólera, toxina de la tos ferina, ricina, gelonina, abrina, exotoxina de la difteria o exotoxina de *Pseudomonas*. Los restos de toxina también pueden ser radionucleidos emisores de alta energía tales como cobalto-60.

El término "paciente" significa según la invención un ser humano, un primate no humano u otro animal, en particular un mamífero tal como vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor tal como ratón y rata. En una forma de realización especialmente preferida, el paciente es un ser humano.

El término "enfermedad" se refiere según la invención a cualquier estado patológico, en el que se expresan o se expresan de manera anómala antígenos asociados a tumores. "Expresión anómala" significa que la expresión con respecto al estado en un individuo sano está modificada, preferentemente aumentada. Un aumento de la expresión se refiere a un aumento de al menos el 10%, en particular al menos el 20%, al menos el 50% o al menos el 100%. En una forma de realización, el antígeno asociado a tumores se expresa sólo en tejido de un individuo enfermo, mientras que la expresión en un individuo sano está reprimida. Un ejemplo de una enfermedad de este tipo es cáncer, comprendiendo el término "cáncer" según la invención leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, gliomas, cáncer renal, de glándula suprarrenal, de tiroides, de intestino, de hígado, de colon, de estómago, gastrointestinal, de ganglios linfáticos, de esófago, colorrectal, de páncreas, de garganta, nariz y oídos (HNO), de mama, de próstata, de útero, ovárico y pulmonar, y sus metástasis.

Una muestra biológica puede ser según la invención una muestra de tejido y/o celular, y puede obtenerse de manera convencional para una utilización en los diferentes procedimientos descritos en la presente memoria, tal como mediante biopsia de tejido, incluyendo biopsia en sacabocados, y extracción de sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales.

El término "célula inmunorreactiva" significa según la invención una célula que puede madurar para dar una célula inmunitaria (tal como célula B, célula T cooperadora o célula T citolítica) en el caso de una estimulación adecuada. Las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34⁺, células T maduras e inmaduras así como células B maduras e inmaduras. Si se desea la producción de células T cooperadoras o citolíticas, que reconocen un antígeno asociado a tumores, se pone en contacto la célula inmunorreactiva con una célula, que expresa un antígeno asociado a tumores, en condiciones que favorecen una producción, diferenciación y/o selección de células T cooperadoras así como citolíticas. La diferenciación de precursores de células T para dar una célula T citolítica en el caso de una exposición a un antígeno es similar a la selección clonal del sistema inmunitario.

Algunos procedimientos terapéuticos se basan en una reacción del sistema inmunitario de un paciente, que conduce a una lisis de células presentadoras de antígeno, tales como células cancerosas, que presentan uno o varios antígenos asociados a tumores. A este respecto, se administran por ejemplo linfocitos T citotóxicos autólogos, que son específicos para un complejo de un antígeno asociado a tumores y una molécula del CMH, a un paciente con una anomalía celular. Se conoce la producción de tales linfocitos T citotóxicos *in vitro*. Un ejemplo de un procedimiento para diferenciar células T se encuentra en el documento WO-A-9633265. En general se toma una muestra con células, tales como células sanguíneas, del paciente y las células se ponen en contacto con una célula, que presenta el complejo y puede desencadenar una multiplicación de linfocitos T citotóxicos (por ejemplo células dendríticas). La célula diana puede ser una célula transfectada, tal como una célula COS. Estas células transfectadas presentan el complejo deseado en su superficie y estimulan su multiplicación en el caso de un contacto con linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos autólogos expandidos de manera clonal se administran después al paciente.

En otro procedimiento para la selección de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno se utilizan tetrámeros fluorógenos de complejos de molécula del CMH de clase I/péptido para detectar clones específicos de linfocitos T citotóxicos (Altman *et al.*, Science 274:94-96, 1996; Dunbar *et al.*, Curr. Biol. 8:413-416, 1998). Las moléculas del CMH de clase I solubles se pliegan *in vitro* en presencia de α_2 -microglobulina y de un antígeno peptídico, que se une a la molécula de clase I. Tras la purificación de los complejos de CMH/péptido, estos se marcan con biotina. Se forman tetrámeros mediante el mezclado de los complejos de péptido-CMH biotinilados con avidina marcada (por ejemplo ficoeritrina) a una razón molar de 4:1. Después se ponen los tetrámeros en contacto con linfocitos T citotóxicos, tal como sangre periférica o ganglios linfáticos. Los tetrámeros se unen a linfocitos T citotóxicos, que reconocen el complejo de antígeno peptídico/CMH de clase I. Las células, que se unen a los tetrámeros, pueden separarse mediante separación celular controlada por fluorescencia para un aislamiento de linfocitos T citotóxicos reactivos. Los linfocitos T citotóxicos aislados pueden multiplicarse después *in vitro*.

En un procedimiento terapéutico, que se denomina transferencia adoptiva (Greenberg, J. Immunol. 136(5):1917,

1986; Riddel *et al.*, Science 257:238, 1992; Lynch *et al.*, Eur. J. Immunol. 21:1403-1410, 1991; Kast *et al.*, Cell 59:603-614, 1989), se combinan células, que presentan el complejo deseado (por ejemplo células dendríticas), con linfocitos T citotóxicos del paciente que va a tratarse, lo que conduce a una multiplicación de linfocitos T citotóxicos específicos. Los linfocitos T citotóxicos multiplicados se administran después a un paciente con una anomalía celular, que se caracteriza por determinadas células anómalas, que presentan el complejo específico. Los linfocitos T citotóxicos lisan después las células anómalas, con lo que se consigue un efecto terapéutico deseado.

A menudo, a partir del repertorio de células T de un paciente únicamente pueden multiplicarse células T de escasa afinidad con respecto a un complejo específico de este tipo, dado que las muy afines se han extinguido por el desarrollo de tolerancia. Una alternativa puede ser en este caso una transferencia del propio receptor de células T. Para ello se combinan igualmente células, que presentan el complejo deseado (por ejemplo células dendríticas) con linfocitos T citotóxicos de personas sanas o de otra especie (por ejemplo ratón). Esto conduce a una multiplicación de linfocitos T citotóxicos específicos con alta afinidad, cuando los linfocitos T proceden de un organismo donante, que hasta la fecha no había tenido ningún contacto con el complejo específico. Se clona el receptor de células T con alta afinidad de estos linfocitos T específicos multiplicados. Si se clonaron los receptores de células T con alta afinidad de otra especie, estos pueden humanizarse en diferente medida. Mediante la transferencia génica, por ejemplo con vectores retrovirales, tales receptores de células T se transducen entonces de manera arbitraria en células T de pacientes. La transferencia adoptiva tiene lugar entonces con estos linfocitos T modificados genéticamente (Stanislowski *et al.*, Nat Immunol. 2:962-70, 2001; Kessels *et al.*, Nat Immunol. 2:957-61, 2001).

Los aspectos terapéuticos anteriores parten de la base de que al menos algunas de las células anómalas del paciente presentan un complejo de un antígeno asociado a tumores y una molécula de HLA. Una identificación de tales células puede tener lugar de manera en sí conocida. En cuanto se identifican las células, que presentan el complejo, pueden combinarse con una muestra del paciente, que contiene linfocitos T citotóxicos. En caso de que las células, que presentan el complejo, se lisen por los linfocitos T citotóxicos, puede asumirse que se presenta un antígeno asociado a tumores.

La transferencia adoptiva no es la única forma de terapia que puede emplearse según la invención. También pueden producirse linfocitos T citotóxicos *in vivo* de manera en sí conocida. En un procedimiento se utilizan células no proliferativas, que expresan el complejo. Las células, que se utilizan a este respecto, serán aquellas que expresen normalmente el complejo, tales como células tumorales irradiadas o células, que se transfectaron con uno o ambos genes, que son necesarios para una presentación del complejo (es decir el péptido antigénico y la molécula de HLA presentadora). Pueden utilizarse diferentes tipos celulares. Por lo demás pueden utilizarse vectores que portan uno o ambos de los genes de interés. Se prefieren especialmente vectores virales o bacterianos. Por ejemplo, pueden asociarse funcionalmente ácidos nucleicos, que codifican para un antígeno asociado a tumores o una parte del mismo, con secuencias promotoras y potenciadoras, que controlan una expresión del antígeno asociado a tumores o de un fragmento del mismo en determinados tejidos o tipos celulares. El ácido nucleico puede incorporarse a un vector de expresión. Los vectores de expresión pueden ser genomas virales, plásmidos o ácidos nucleicos extracromosómicos no modificados, en los que es posible una inserción de ácidos nucleicos exógenos. También pueden insertarse ácidos nucleicos, que codifican para un antígeno asociado a tumores, en un genoma retroviral, con lo que se hace posible la integración del ácido nucleico en el genoma del tejido diana o de la célula diana. En estos sistemas, un microorganismo tal como virus vaccinia, virus de la viruela, virus del herpes simple, retrovirus o adenovirus porta el gen de interés e "infecta" de hecho células huésped. Una forma preferida adicional es la introducción del antígeno asociado a tumores en forma de ARN recombinante. Este puede introducirse por ejemplo mediante transferencia liposómica o mediante electroporación en células. Las células resultantes presentan el complejo de interés y se reconocen por linfocitos T citotóxicos autólogos, que después se multiplican.

Puede conseguirse un efecto similar mediante la combinación del antígeno asociado a tumores o de un fragmento del mismo con un adyuvante, para permitir una incorporación en células presentadoras de antígeno *in vivo*. El antígeno asociado a tumores o un fragmento del mismo pueden estar representados como proteína, como ADN (por ejemplo dentro de un vector) o como ARN. El antígeno asociado a tumores se procesa para dar como resultado una pareja peptídica para la molécula de HLA, mientras que puede presentarse un fragmento del mismo sin que sea necesario un procesamiento adicional. Esto último es en particular el caso, cuando estos pueden unirse a moléculas de HLA. Se prefieren formas de administración en las que el antígeno completo se procesa *in vivo* por una célula dendrítica, dado que en este caso también pueden generarse respuestas de células T cooperadoras. Una respuesta inmunitaria eficaz las requiere (Ossendorp *et al.*, Immunol Lett. 74:75-9, 2000; Ossendorp *et al.*, J. Exp. Med. 187:693-702, 1998). En general puede administrarse una cantidad eficaz del antígeno asociado a tumores a un paciente, por ejemplo mediante una inyección intradérmica. Sin embargo, la inyección también puede tener lugar por vía intranodal en un ganglio linfático (Maloy *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 98:3299-303, 2001). También puede tener lugar en combinación con reactivos, que facilitan una absorción en células dendríticas. Los antígenos asociados a tumores preferidos comprenden aquellos que reaccionan con antisueros de cáncer alogénicos o con células T de muchos pacientes con cáncer. Sin embargo, también son de especial interés aquellos para los que no existe previamente ninguna respuesta inmunitaria espontánea. Contra estos pueden inducirse respuestas inmunitarias, tal como puede demostrarse, que pueden lisan tumores (Keogh *et al.*, J Immunol. 167:787-96, 2001; Appella *et al.*, Biomed Pept Proteins Nucleic Acids 1:177-84, 1995; Wentworth *et al.*, Mol Immunol. 32:603-12, 1995).

Las composiciones farmacéuticas descritas según la divulgación también pueden utilizarse como vacunas para la inmunización. Los términos "inmunización" o "vacunación" significan según la invención un aumento o una activación de una reacción inmunitaria frente a un antígeno. Pueden utilizarse modelos animales para someter a prueba una acción inmunizadora frente al cáncer mediante la utilización de un antígeno asociado a tumores o de un ácido nucleico que codifica para el mismo. Por ejemplo, pueden introducirse células cancerosas humanas en un ratón para crear un tumor y pueden administrarse uno o varios ácidos nucleicos, que codifican para antígenos asociados a tumores. El efecto sobre las células cancerosas (por ejemplo reducción del tamaño del tumor) puede medirse como magnitud para la eficacia de una inmunización mediante el ácido nucleico.

Como parte de la composición para una inmunización se administran uno o varios antígenos asociados a tumores o fragmentos estimuladores de los mismos con uno o varios adyuvantes para inducir una reacción inmunitaria o aumentar una reacción inmunitaria. Un adyuvante es una sustancia que se incorpora en el antígeno o se administra conjuntamente con el mismo y potencia la reacción inmunitaria. Los adyuvantes pueden potenciar la reacción inmunitaria proporcionando un reservorio de antígeno (extracelular o en macrófagos), activando macrófagos y/o estimulando determinados linfocitos. Los adyuvantes se conocen y comprenden de manera no limitativa monofosforil-lípido A (MPL, SmithKline Beecham), saponinas tales como QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; documento WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 y QS-L1 (So *et al.*, Mol. Cells 7:178-186, 1997), adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, vitamina E, montanida, alumbre, oligonucleótidos de CpG (véase Kreig *et al.*, Nature 374:546-9, 1995) y diferentes emulsiones de agua en aceite, que se producen a partir de aceites biodegradables tales como escualeno y/o tocoferol. Preferentemente, los péptidos se administran en una mezcla con DQS21/MPL. La razón de DQS21 con respecto a MPL asciende normalmente a aproximadamente de 1:10 a 10:1, preferentemente a aproximadamente de 1:5 a 5:1 y en particular a aproximadamente 1:1. Para una administración al ser humano, DQS21 y MPL están presentes normalmente en una formulación de vacuna en un intervalo de desde aproximadamente 1 μ g hasta aproximadamente 100 μ g.

También pueden administrarse otras sustancias, que estimulan una reacción inmunitaria del paciente. Por ejemplo, las citocinas, debido a sus propiedades reguladoras, pueden utilizarse sobre linfocitos en una vacunación. Tales citocinas comprenden por ejemplo interleucina-12 (IL-12), de la que se mostró que potencia los efectos protectores de vacunas (véase Science 268:1432-1434, 1995), GM-CSF e IL-18.

Hay una serie de compuestos, que potencian una reacción inmunitaria y que por tanto pueden utilizarse en una vacunación. Estos comprenden moléculas coestimuladoras, que se proporcionan en forma de proteínas o ácidos nucleicos. Tales moléculas coestimuladoras son por ejemplo B7-1 y B7-2 (CD80 o CD86), que se expresan en células dendríticas (DC) e interaccionan con la molécula de CD28 expresada en las células T. Esta interacción proporciona una coestimulación (señal 2) para una célula T estimulada por antígeno/CMH/TCR (señal 1), con lo que se potencia la multiplicación de la célula T y la función efectora. B7 interacciona también con CTLA4 (CD152) en células T y estudios que incluyen ligandos CTLA4 y B7 muestran que la interacción B7-CTLA4 puede potenciar una inmunidad antitumoral y multiplicación de CTL (Zheng, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(11):6284-6289 (1998)).

B7 no se expresa normalmente en células tumorales, de modo que estas no son células presentadoras de antígeno (APC) eficaces para células T. Una inducción de la expresión de B7 permitiría que células tumorales estimularan de manera más eficaz una multiplicación de linfocitos T citotóxicos y una función efectora. Una coestimulación mediante una combinación de B7/IL-6/IL-12 mostró una inducción del perfil de IFN-gamma y Th1-citocina en una población de células T, lo que conduce a una actividad de células T potenciada adicionalmente (Gajewski *et al.*, J. Immunol. 154:5637-5648 (1995)).

Una activación completa de linfocitos T citotóxicos y una función efectora completa requiere una acción conjunta de células T cooperadoras mediante la interacción entre el ligando CD40 en las células T cooperadoras y la molécula de CD40, que se expresa por células dendríticas (Ridge *et al.*, Nature 393:474 (1998), Bennett *et al.*, Nature 393:478 (1998), Schönberger *et al.*, Nature 393:480 (1998)). El mecanismo de esta señal coestimuladora se refiere probablemente al aumento de la producción de B7 y de IL-6/IL-12 asociada por las células dendríticas (células presentadoras de antígeno). La interacción CD40-CD40L complementa así las interacciones de la señal 1 (antígeno/CMH-TCR) y de la señal 2 (B7-CD28).

La utilización de anticuerpos anti-CD40 para una estimulación de células dendríticas potenciaría, tal como se espera, directamente una reacción frente a antígenos tumorales, que se encuentran normalmente fuera del rango de una reacción inflamatoria o se presentan por células presentadoras de antígeno no profesionales (células tumorales). En estas situaciones no se proporcionan señales coestimuladoras de células T cooperadoras y B7. Este mecanismo podría utilizarse en relación con terapias, que se basan en células dendríticas pulsadas con antígeno.

Según la divulgación también está prevista una administración de ácidos nucleicos, polipéptidos o péptidos. Una administración de polipéptidos y péptidos puede tener lugar de manera en sí conocida. En una forma de realización, la administración de ácidos nucleicos tiene lugar mediante procedimientos *ex vivo*, es decir mediante la extracción de células de un paciente, la modificación genética de las células, para incorporar un antígeno asociado a tumores, y la nueva introducción de las células modificadas en el paciente. Esto comprende en general la introducción de una

5 copia funcional de un gen en las células de un paciente *in vitro* y la devolución de las células modificadas genéticamente al paciente. La copia funcional del gen está bajo el control funcional de elementos reguladores, que permiten una expresión del gen en las células modificadas genéticamente. El experto en la materia conoce procedimientos de transfección y de transducción. Según la divulgación también está prevista una administración de ácidos nucleicos *in vivo* mediante la utilización de vectores, tales como virus y liposomas controlados de manera dirigida.

10 En una forma de realización preferida, un vector viral para la administración de un ácido nucleico, que codifica para un antígeno asociado a tumores, se selecciona de entre el grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, virus de la viruela, incluyendo virus vaccinia y virus de la viruela atenuados, virus del bosque Semliki, retrovirus, virus Sindbis y partículas similares a virus Ty. Se prefieren especialmente adenovirus y retrovirus. Los retrovirus son habitualmente deficientes en la replicación (es decir, no pueden generar partículas infecciosas).

15 Pueden utilizarse diferentes procedimientos para introducir ácidos nucleicos en células *in vitro* o *in vivo*. Tales procedimientos comprenden la transfección de precipitados de ácido nucleico-CaPO₄, la transfección de ácidos nucleicos que están asociados con DEAE, la transfección o infección con los virus anteriores, que portan los ácidos nucleicos de interés, la transfección mediada por liposomas y similares. En determinadas formas de realización se prefiere un control del ácido nucleico en determinadas células. En tales formas de realización, un portador, que se utiliza para la administración de un ácido nucleico a una célula (por ejemplo un retrovirus o un liposoma), puede presentar una molécula de control dirigido unida. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo, que es específico para una proteína de la membrana superficial en la célula diana, o un ligando para un receptor en la célula diana pueden incorporarse al portador de ácido nucleico o unirse al mismo. Los anticuerpos preferidos comprenden anticuerpos que se unen selectivamente a un antígeno asociado a tumores. En caso de que se desee una administración de un ácido nucleico mediante liposomas, pueden incorporarse proteínas, que se unen a una proteína de la membrana superficial, que está asociada con la endocitosis, en la formulación liposómica, para permitir un control dirigido y/o una captación. Tales proteínas comprenden proteínas de cápside o fragmentos de las mismas, que son específicas para un determinado tipo celular, anticuerpos frente a proteínas, que se internalizan, proteínas, que se dirigen a un sitio intracelular, y similares.

20 30 Las composiciones terapéuticas según la invención pueden administrarse en preparaciones farmacéuticamente compatibles. Tales preparaciones pueden contener habitualmente concentraciones farmacéuticamente compatibles de sales, sustancias tampón, conservantes, portadores, sustancias complementarias que aumentan la inmunidad tales como adyuvantes, CpG y citocinas, y dado el caso otros principios activos terapéuticos.

35 Los principios activos terapéuticos según la invención pueden administrarse por cualquier vía convencional, incluyendo mediante inyección o mediante infusión. La administración puede tener lugar, por ejemplo, por vía oral, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía transdérmica. Una administración terapéutica de anticuerpos tiene lugar preferentemente mediante un aerosol pulmonar. La administración de ácidos nucleicos antisentido tiene lugar preferentemente mediante una administración intravenosa lenta.

40 45 Las composiciones se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad, que sola o junto con dosis adicionales consigue una reacción deseada o un efecto deseado. En el caso de un tratamiento de una determinada enfermedad o de un determinado estado, que se caracteriza por la expresión de uno o varios antígenos asociados a tumores, la reacción deseada se refiere a la inhibición de la evolución de la enfermedad. Esto comprende la ralentización del progreso de la enfermedad y en particular una interrupción del progreso de la enfermedad. La reacción deseada en el caso de un tratamiento de una enfermedad o de un estado también puede ser la ralentización de la aparición o impedir la aparición de la enfermedad o del estado.

50 Una cantidad eficaz de una composición dependerá del estado que va a tratarse, de la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluyendo edad, estado fisiológico, altura y peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia concomitante (en caso de existir), la vía de administración específica y factores similares.

55 Las composiciones farmacéuticas son preferentemente estériles y contienen una cantidad eficaz de la sustancia terapéuticamente eficaz para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

60 Las dosis de las composiciones que se administran pueden depender de diferentes parámetros tales como el tipo de administración, el estado del paciente, el periodo de tiempo de administración deseado, etc. Para el caso en el que una reacción en un paciente con una dosis inicial sea insuficiente, pueden utilizarse dosis más altas (o dosis con una eficacia más alta, que la conseguida con otra vía de administración más localizada).

65 En general, para un tratamiento o para generar o aumentar una reacción inmunitaria se formulan y se administran dosis del antígeno asociado a tumores de desde 1 ng hasta 1 mg, preferentemente de desde 10 ng hasta 100 µg. Si se desea la administración de ácidos nucleicos (ADN así como ARN), que codifican para antígenos asociados a tumores, se formulan y se administran dosis de desde 1 ng hasta 0,1 mg.

Las composiciones farmacéuticas se administran en general en cantidades farmacéuticamente compatibles y se administran en composiciones farmacéuticamente compatibles. El término "farmacéuticamente compatible" se refiere a un material no tóxico, que no interacciona con el efecto del componente activo de la composición farmacéutica. Tales preparaciones pueden contener habitualmente sales, sustancias tampón, conservantes, portadores y dado el caso otros principios activos terapéuticos. En el caso de una utilización en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente compatibles. Sin embargo, pueden utilizarse sales farmacéuticamente no compatibles para la producción de sales farmacéuticamente compatibles de las mismas y están comprendidas según la divulgación. Tales sales farmacológicamente y farmacéuticamente compatibles comprenden de manera no limitativa aquellas producidas a partir de los siguientes ácidos: ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales farmacéuticamente compatibles también pueden producirse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Una composición farmacéutica puede comprender un portador farmacéuticamente compatible. El término "portador farmacéuticamente compatible" se refiere a una o varias cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias de encapsulación, que son adecuados para una administración a un ser humano. El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el que se combina el componente activo, para facilitar su aplicación. Los componentes de la composición farmacéutica son habitualmente de tal manera que no se produce ninguna interacción, que perjudique esencialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener sustancias tampón 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 dado el caso conservantes adecuados tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan habitualmente en una forma farmacéutica uniforme y pueden producirse de manera en sí conocida. Las composiciones farmacéuticas pueden estar presentes por ejemplo en forma de cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones, jarabes, elixires o como emulsión.

Las composiciones, que son adecuadas para una administración parenteral, comprenden habitualmente una preparación acuosa o no acuosa estéril del principio activo, que preferentemente es isotónica con la sangre del receptor. Portadores y disolventes compatibles son, por ejemplo, solución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Adicionalmente se utilizan habitualmente aceites fijos, estériles como medio de disolución o suspensión.

La presente invención se describe en detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos, que sirven a modo de explicación. Debido a la descripción y a los ejemplos, formas de realización adicionales son accesibles para el experto en la materia.

Figuras:

Figura 1. Expresión de claudina-18A2.1 en el estómago, esófago, carcinoma de estómago y de páncreas

El análisis mediante RT-PCR con cebadores específicos para claudina-18A2.1 (SEC ID N°: 39, 40) mostró según la invención en 8/10 biopsias de carcinoma de estómago, así como en 3/6 biopsias de carcinoma de páncreas una expresión de claudina-18A2.1 pronunciada. En tejido normal de estómago y de esófago se detectó igualmente una expresión clara. A diferencia de esto, no se detectó expresión en el ovario y en el carcinoma de ovario.

Figura 2. Representación esquemática de variantes de corte y empalme de claudina-18

Las dos variantes de corte y empalme de claudina-18 A1 y A2 se diferencian en el extremo N-terminal y muestran diferentes sitios de glicosilación potenciales.

Figura 3. Expresión cuantitativa de claudina-18, variante A1

La claudina-A1 está fuertemente activada en un gran número de tejidos tumorales. Una expresión especialmente fuerte se encuentra en tumores de estómago, tumores de pulmón, carcinomas de páncreas y carcinomas de esófago.

Figura 4. Expresión cuantitativa de claudina-18, variante A2

Como la variante A1, la variante A2 está activada en muchos tumores.

Figura 5. Utilización de anticuerpos específicos para claudina-18A2 (dominio extracelular)

(Arriba) Tinción de células de carcinoma de estómago positivas para claudina-18A2 (SNU-16) con un anticuerpo, que se produjo mediante inmunización con un péptido (SEC ID N°: 17). La tinción de la membrana se produce de manera especialmente intensa en las regiones de interacción célula/célula. A - preimmun., MeOH; B - suero inmunitario MeOH, 5 µg/ml (Abajo) Detección de la especificidad del anticuerpo mediante análisis de colocalización en células 293T transfectadas con claudina-18A2-GFP. A - claudina-18A2-GFP; B - anticuerpo anti-claudina-A2; C - superposición.

Figura 6. Utilización de anticuerpos específicos para claudina-18A2 (dominio extracelular)

La tinción de la membrana de células de carcinoma de estómago positivas para claudina-18A2 (SNU-16) con un anticuerpo, que se produjo mediante inmunización con un péptido (SEC ID N°: 113, dominio extracelular dispuesto en el extremo N-terminal). Para la contratinción se utilizó un anticuerpo monoclonal, que va dirigido contra la E-cadherina. A - anticuerpo; B - contratinción; C - superposición.

Figura 7. Utilización de anticuerpos contra el dominio extracelular C-terminal de claudina-18

(Izquierda, arriba y abajo) Tinción de la membrana de células de carcinoma de estómago positivas para claudina-18A2 (SNU-16) con un anticuerpo, que se produjo mediante inmunización con un péptido (SEC ID N°: 116, dominio extracelular dispuesto en el extremo C-terminal). Para la contratinción se utilizó un anticuerpo monoclonal, que va dirigido contra la E-cadherina (arriba a la derecha, abajo).

Figura 8. Utilización de anticuerpos específicos para claudina-18A1

(Arriba) Tinción de débil a ausente de células de carcinoma de estómago (SNU-16; positivas para claudina-18A2) con un anticuerpo, que se produjo mediante inmunización con un péptido específico para claudina-18A1 (SEC ID N°: 115). A - anticuerpo anti-E-cadherina; B - anticuerpo anti-claudina-18A1; C - superposición.

(Abajo) Detección de la especificidad del anticuerpo mediante análisis de colocalización en células 293T transfectadas con claudina-18A1-GFP. A - GFP-claudina-18A1; B - anticuerpo anti-claudina-18A1; C - superposición.

Figura 9. Detección de claudina-18A2 en la inmunotransferencia de tipo Western.

Inmunotransferencia de tipo Western con lisados de diferentes tejidos sanos con un anticuerpo específico para claudina-18A2, dirigido contra el epítipo con SEC ID N°: 17. 1 - estómago; 2 - testículos; 3 - piel; 4 - mama; 5 - hígado; 6 - intestino grueso; 7 - pulmón; 8 - riñón; 9 - ganglios linfáticos.

Figura 10. Inmunotransferencia de tipo Western para claudina-18A2 con muestras de estómago y tumores de estómago

Se sometieron a inmunotransferencia lisados de estómago y tumores de estómago y se sometieron a prueba con un anticuerpo específico para claudina-18A2 contra el epítipo con SEC ID N°: 17. Los tumores de estómago presentan una forma menos glicosilada de claudina-18A2. El tratamiento con PNGasa F de lisados de estómago conduce a la formación de la forma poco glicosilada.

Izquierda: 1 - estómago norm. #A; 2 - estómago tum. #A; 3 - estómago norm. #B; 4 - estómago tum. #B. Derecha: 1 - estómago norm. #A; 2 - estómago norm. #B; 3 - estómago norm. #B + PNGasa F; 4 - estómago tum. #C; 5 - estómago tum. #D; 6 - estómago tum. #D + PNGasa F

Figura 11. Expresión de claudina-18 en tumores de pulmón

De manera correspondiente a la figura 10 tuvo lugar una detección de variantes de claudina-18A2 poco glicosiladas en tumores de pulmón. 1 - estómago norm.; 2 - estómago tum.; 3-9 - pulmón tum.

Figura 12. Análisis inmunohistoquímico de claudina-18 con anticuerpos específicos para claudina-18A2 en tejido tumoral de estómago

Figura 13. Inmunofluorescencia indirecta de células Snu16 específicas para estómago con un antisuero policlonal específico para claudina-18

A. Tinción con un suero preinmunitario, generado antes de la inmunización; B. Tinción con el suero específico para claudina-18.

Figura 14. Secuencias

Se muestran las secuencias, a las que se remite en la presente memoria.

Ejemplos:Material y métodos

5 Los términos “*in silico*”, “electrónicamente” y “clonar virtualmente” se refieren meramente a la utilización de procedimientos basados en bases de datos, con los que también pueden simularse operaciones experimentales de laboratorio.

10 A menos que se defina explícitamente lo contrario, todos los demás términos se utilizan de modo que los entienda el experto en la materia. Dichas técnicas y métodos se llevan a cabo de manera en sí conocida y se describen por ejemplo en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. Todos los procedimientos, que incluyen la utilización de kits y reactivos, se llevan a cabo de manera correspondiente a las instrucciones del fabricante.

15 Estrategia basada en minería de datos para determinar eCT nuevos genes asociados a tumores

Se combinaron dos estrategias *in silico* concretamente búsqueda de palabras clave en GenBank y el cDNAXProfiler. Utilizando el sistema de búsqueda y recuperación ENTREZ del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) se llevó a cabo una búsqueda de genes candidatos en GenBank, para los que se indica que se expresan específicamente en determinados tejidos (Wheeler *et al.*, Nucleic Acids Research 28:10-14, 2000).

20 Mediante consultas de búsqueda con palabras clave tal como por ejemplo “gen específico de colon” (“*colon-specific gene*”), “gen específico de estómago” (“*stomach-specific gene*”) o “gen específico de riñón” (“*kidney-specific gene*”) se extrajeron los genes candidatos (GOI, *genes of interest*) de las bases de datos. La búsqueda se limitó a una parte de toda la información de estas bases de datos, utilizando como límites “*homo sapiens*” para el organismo y “ARNm” para el tipo de molécula.

Se supervisó la lista de los GOI encontrados, detectando diferentes denominaciones para la misma secuencia y eliminando tales redundancias.

30 Todos los genes candidatos, que se obtuvieron mediante la búsqueda de palabras clave, se estudiaron a su vez mediante el procedimiento del “Northern electrónico” (eNorthern) con respecto a su distribución tisular. El eNorthern se basa en que se compara la secuencia de un GOI con una base de datos de EST (*expressed sequence tag*, etiqueta de secuencia expresada) (Adams *et al.*, Science 252:1651, 1991) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para cada EST, que se obtiene como resultado que es homóloga al GOI introducido, puede determinarse el origen del tejido y mediante la suma de todas las EST conseguirse de esta manera una estimación provisional de la distribución tisular del GOI. Solo se suministraron a estudios adicionales aquellos GOI que no presentaban ninguna homología con EST de tejidos normales no específicos de órganos. Para esta evaluación también se tuvo en cuenta que hay bases de datos de ADNc con anotaciones incorrectas en el dominio público (Scheurle *et al.*, Cancer Res. 60:4037-4043, 2000) (www.fau.edu/cmabb/publications/cancergenes6.htm). Como segundo procedimiento de minería de datos se utilizó el cDNA xProfiler del proyecto de Anatomía del genoma del cáncer del NCBI (<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler>) (Hillier *et al.*, Genome Research 6:807-828, 1996; Pennisi, Science 276:1023-1024, 1997). Este permite relacionar entre sí conjuntos de transcriptomas depositados en bases de datos mediante operadores lógicos. Se definió un conjunto A, al que se asociaron todas las bibliotecas de expresión producidas a partir de colon, excluyendo bibliotecas mixtas. Al conjunto B se asociaron todas las bibliotecas de ADNc, que se habían producido de tejidos normales excluyendo colon. En general se utilizaron todas las bases de datos de ADNc independientemente de los procedimientos de producción subyacentes, sin embargo solo se autorizaron aquellos con una potencia > 1000. Por medio del operador PERO NO se restó el conjunto B digitalmente del conjunto A. También se sometió el conjunto de GOI encontrados de esta manera a estudios de tipo eNorthern, y se aseguró mediante una búsqueda de bibliografía. Esta minería de datos combinada incluye todos los aproximadamente 13000 genes de longitud completa en el dominio público y predice, de estos, genes con una expresión específica de órganos potencial.

55 Todos los demás genes se evaluaron en primer lugar mediante RT-PCR específica en tejidos normales. Todos los GOI, que demostraron que se expresaban en tejidos normales no específicos de órganos, tuvieron que considerarse falsos positivos y se excluyeron de los estudios adicionales. Los restantes se estudiaron en un gran panel de los más diversos tejidos tumorales. A este respecto, los antígenos expuestos más adelante demostraron estar activados en células tumorales.

60 Extracción de ARN, producción de ADNc cebado con poli-d(T) y análisis mediante RT-PCR convencional

Se extrajo el ARN total de material tisular nativo utilizando isotiocianato de guanidio como agente caotrópico (Chomczynski y Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-9, 1987). Tras la extracción con fenol ácido y precipitación con isopropanol se disolvió el ARN en agua tratada con DEPC.

65 A partir de 2-4 μ g de ARN total, en una mezcla básica de reacción de 20 μ l por medio de Superscript II (Invitrogen)

de manera correspondiente a las instrucciones del fabricante se llevó a cabo una síntesis de ADNc de primera cadena. Como cebador se utilizó un oligonucleótido dT(18). Se comprobaron la integridad y la calidad del ADNc mediante la amplificación de p53 en una PCR de 30 ciclos (sentido CGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCG, antisentido CCTAACCAGCTGCCCAACTGTAG, temperatura de hibridación 67°C).

Se produjo un archivo de ADNc de primera cadena a partir de una serie de tejidos normales y entidades tumorales. Para estudios de expresión se amplificaron 0,5 μ l de estos ADNc en una mezcla básica de reacción de 30 μ l con cebadores específicos para GOI (véase más adelante) y 1 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen). La mezcla básica de reacción contenía en cada caso dNTP 0,3 mM, por cada 0,3 μ M de cada cebador y 3 μ l de 10 x tampón de reacción.

Los cebadores se seleccionaron de tal manera que se encuentran en 2 exones diferentes y la eliminación de la interferencia mediante ADN genómico contaminante como motivo para resultados falsos positivos se confirmó mediante pruebas de ADN no transcrito de manera inversa como matriz. Tras 15 minutos a 95°C para la activación de la ADN polimerasa HotStarTaq se llevaron a cabo 35 ciclos de PCR (1 min 94°C, 1 min respectiva temperatura de hibridación, 2 min 72°C y elongación final a 72°C durante 6 min). Se separaron 20 μ l de esta reacción en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se analizaron.

Se utilizaron los siguientes cebadores para el análisis de expresión de los antígenos correspondientes a la temperatura de hibridación indicada.

Claudina-18A2 (68°C)

Sentido1: 5'-GGTTCGTGGTTTCACTGATTGGGATTGC-3' (SEC ID N°: 39)

Antisentido1: 5'-CGGCTTTGTAGTTGGTTTCTTCTGGTG-3' (SEC ID N°: 40)

Sentido2: 5'-TGTTTTCAACTACCAGGGGC-3' (SEC ID N°: 107)

Antisentido2: 5'-TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC-3' (SEC ID N°: 108)

Claudina-18A1 (64°C)

Sentido: 5'-GAGGCAGAGTTCAGGCTTCACCGA-3' (SEC ID N°: 109)

Antisentido: 5'-TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC-3' (SEC ID N°: 110)

Producción de ADNc cebado con hexámero aleatorio y PCR cuantitativa en tiempo real

Se cuantificó la expresión de varios genes por medio de PCR en tiempo real.

A este respecto, se detectaron los productos de PCR con SYBR verde como colorante indicador de intercalación. La fluorescencia indicadora de SYBR verde se suprime en disolución y solo tras la unión a fragmentos de ADN bicatenario es activo el colorante. El aumento de la fluorescencia de SYBR verde como consecuencia de la amplificación específica por medio de cebadores específicos para GOI tras cada ciclo de PCR se aprovecha para la cuantificación. La cuantificación de la expresión del gen diana tiene lugar de manera absoluta o relativa con respecto a la expresión de un gen de control con expresión constante en los tejidos que van a estudiarse. La expresión se determinó tras la normalización de las muestras frente a ARN 18s como denominado gen de mantenimiento por medio del método de $\Delta\Delta$ -C_t (PE Biosystems, EE. UU.). Las reacciones se realizaron en mezclas básicas dobles y se determinaron por triplicado. Se utilizó el kit de PCR QuantiTect SYBR-Green (Qiagen, Hilden) según las instrucciones del fabricante. La síntesis del ADNc tuvo lugar con el kit High Capacity cDNA Archive (PE Biosystems, EE. UU.) utilizando cebadores hexámeros según las instrucciones del fabricante. En cada caso se utilizaron 5 μ l del ADNc diluido en 25 μ l del volumen total para la PCR: cebador sentido 300 nM, cebador antisentido 300 nM; desnaturalización inicial 95°C 15 min; 95°C 30 s; hibridación 30 s; 72°C 30 s; 40 ciclos. Las secuencias de los cebadores utilizados se exponen en los respectivos ejemplos.

Clonación y análisis de secuencias

La clonación de longitudes completas o fragmentos génicos tuvo lugar según los métodos habituales. Para la determinación de la secuencia se amplificaron los antígenos correspondientes por medio de polimerasa de lectura de comprobación pfu (Stratagene). Tras finalizar la PCR se ligó adenosina por medio de ADN polimerasa HotStarTaq a los extremos del amplicón para clonar los fragmentos de manera correspondiente a las instrucciones del fabricante en el vector TOPO-TA. La secuenciación se llevó a cabo mediante un servicio comercial. Las secuencias se analizaron mediante programas de predicción y algoritmos habituales.

Inmunotransferencia de tipo Western

Se lisan células de cultivo celular (expresión endógena del gen diana o síntesis de la proteína diana tras la transfección de un vector de expresión, que codifica para la proteína diana) o muestras de tejido, que pueden contener la proteína diana, en una disolución de SDS al 1%. A este respecto, el SDS desnatura las proteínas contenidas en el lisado. Los lisados de una mezcla básica experimental se separan electroforéticamente según el tamaño en función del tamaño de proteína esperado sobre geles de poliacrilamida de desnaturación al 8-15% (contienen SDS al 1%) (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, SDS-PAGE). A continuación se transfieren las proteínas mediante el procedimiento de electrotransferencia semiseca (Biorad) a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher y Schüll), en la que puede detectarse la proteína deseada. Para ello se bloquea en primer lugar la membrana (por ejemplo con leche en polvo) y a continuación se incuba con el anticuerpo específico en una dilución de 1:20-1:200 (según la especificidad del anticuerpo) durante 60 minutos. Tras una etapa de lavado se incuba la membrana con un segundo anticuerpo, acoplado con un marcador (por ejemplo enzimas tales como peroxidasa o fosfatasa alcalina), que reconoce el primer anticuerpo. Tras una etapa de lavado adicional, a continuación se hace visible la proteína diana en una reacción colorimétrica o quimioluminiscente sobre la membrana por medio de una reacción enzimática (por ejemplo ECL, Amersham Bioscience). El resultado se documenta mediante la grabación con una cámara adecuada.

El análisis de modificaciones de proteínas tiene lugar por regla general con inmunotransferencia de tipo Western. Las glicosilaciones, que por regla general presentan un tamaño de varios kDa, conducen a una mayor masa total de la proteína diana, que puede separarse en la SDS-PAGE. Para detectar enlaces O- y N-glicosídicos específicos se incuban lisados proteicos de tejidos o células antes de la desnaturación mediante SDS con O- o N-glicosidasas (según las instrucciones del respectivo fabricante, por ejemplo PNGasa, endoglicosidasa F, endoglicosidasa H, Roche Diagnostics). A continuación tiene lugar una inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió anteriormente. En el caso de la reducción del tamaño de una proteína diana puede detectarse así tras la incubación con una glicosidasa una glicosilación específica y de este modo analizarse también la especificidad tumoral de una modificación. Con algoritmos y programas predictivos puede predecirse la posición exacta del aminoácido glicosilado.

Inmunofluorescencia

Se utilizan células de líneas celulares establecidas, que o bien sintetizan la proteína diana de manera endógena (detección del ARN en la RT-PCR o de la proteína en la inmunotransferencia de tipo Western) o bien se han transfectado antes de la IF con ADN de plásmido. Para la transfección de líneas celulares con ADN están ampliamente establecidos los métodos más diversos (por ejemplo electroporación, transfección basada en liposomas, precipitación con fosfato de calcio) (por ejemplo Lemoine *et al.* Methods Mol. Biol. 1997; 75: 441-7). El plásmido transfectado puede codificar en la inmunofluorescencia para la proteína no modificada o también acoplar diferentes marcadores de aminoácidos a la proteína diana. Los marcadores más importantes son, por ejemplo, la "proteína verde fluorescente" (GFP) en sus diferentes formas que fluorescen de manera diferencial y secuencias peptídicas cortas de 6-12 aminoácidos, para las que están disponibles anticuerpos con alta afinidad y específicos. Las células, que sintetizan la proteína diana, se fijan con paraformaldehído, saponina o metanol. A continuación pueden permeabilizarse las células en caso necesario mediante la incubación con detergentes (por ejemplo Triton X-100 al 0,2%). Tras la fijación/permeabilización se incuban las células con un anticuerpo primario, que va dirigido contra la proteína diana o contra uno de los marcadores acoplados. Tras una etapa de lavado se incuba la mezcla básica con un segundo anticuerpo, acoplado con un marcador fluorescente (por ejemplo fluoresceína, Texas Red, Dako), que se une al primer anticuerpo. A continuación se recubren las células así marcadas con glicerina y se analizan con ayuda de un microscopio de fluorescencia según las instrucciones del fabricante. A este respecto se consiguen emisiones de fluorescencia específicas, en función de las sustancias utilizadas, mediante una excitación específica. El análisis permite por regla general la localización segura de la proteína diana, tiñéndose para la confirmación de la calidad del anticuerpo y de la proteína diana en tinciones dobles, además de la proteína diana, también los marcadores de aminoácidos acoplados u otras proteínas marcadoras, cuya localización ya se describe en la bibliografía. Un caso especial lo representan la GFP y sus derivados, que puede excitarse directamente y presentan fluorescencia por sí mismos, de modo que no son necesarios anticuerpos para la detección.

Inmunohistoquímica

La IHC sirve en detalle para (1) poder estimar la cantidad de proteína diana en tejidos tumorales y normales, (2) analizar cuántas células en el tejido tumoral y sano sintetizan el gen diana, y/o (3) definir el tipo celular en un tejido (tumor, células sanas), en el que puede detectarse la proteína diana.

Según el anticuerpo individual, tienen que utilizarse diferentes protocolos (por ejemplo "Diagnostic Immunohistochemistry by David J., MD Dabbs ISBN: 0443065667" o en "Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron Microscopy ISBN: 0306467704").

La inmunohistoquímica (IHC) en muestras de tejido específicas sirve para detectar proteínas en el tejido correspondiente. El propósito de este procedimiento es identificar la ubicación de una proteína en un complejo tisular funcionalmente intacto. La IHC sirve en detalle para (1) poder estimar la cantidad de proteína diana en tejidos

tumorales y normales, (2) analizar cuántas células en el tejido tumoral y sano sintetizan el gen diana, y (3) definir el tipo celular en un tejido (tumor, células sanas), en el que puede detectarse la proteína diana. Alternativamente pueden cuantificarse las cantidades de proteína de un gen diana mediante inmunofluorescencia tisular por medio de una cámara digital y un software adecuado (por ejemplo Tillvision, Till-photonics, Alemania). La tecnología se ha publicado a menudo; por tanto pueden extraerse detalles para la tinción y microscopía por ejemplo de "Diagnostic Immunohistochemistry" de David J., MD Dabbs ISBN: 0443065667 o "Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron Microscopy" ISBN: 0306467704. Debe tenerse en cuenta que debido a las propiedades de los anticuerpos tienen que utilizarse diferentes protocolos (a continuación se describe un ejemplo), para llegar a un resultado con valor informativo.

Por regla general se utilizan en la IHC tejidos tumorales definidos histológicamente y como referencia tejidos sanos comparables. A este respecto, como controles positivos y negativos pueden servir también líneas celulares, en las que se conoce la presencia del gen diana por análisis mediante RT-PCR. Debe realizarse siempre al mismo tiempo un control de fondo.

Los tejidos fijados (por ejemplo fijación con sustancias que contienen aldehído, formaldehído, paraformaldehído o en disoluciones alcohólicas) o en trozos de tejido congelados de manera ultrarrápida con un grosor de 1-10 μ m se colocan sobre un soporte de vidrio. Las muestras incrustadas en parafina se desparafinan por ejemplo con xileno. Las muestras se lavan con TBS-T y se bloquean en suero. A continuación tiene lugar la incubación con el primer anticuerpo (dilución: de 1:2 a 1:2000) durante 1-18 horas, utilizándose por regla general anticuerpos purificados por afinidad. Tras una etapa de lavado tiene lugar una incubación de aproximadamente 30-60 minutos con un segundo anticuerpo, que está acoplado con una fosfatasa alcalina (alternativamente: por ejemplo peroxidasa) y va dirigido contra el primer anticuerpo. A continuación tiene lugar una reacción colorimétrica utilizando las sustancias colorantes que se hacen reaccionar por la enzima unida (véanse por ejemplo Shi *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 39: 741-748, 1991; Shin *et al.*, Lab. Invest. 64: 693-702, 1991). Para detectar la especificidad de anticuerpo puede hacerse que la reacción sea de competencia, mediante la adición previa del inmunógeno.

Inmunización

(Véanse también 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).

A continuación se describe brevemente el proceso de producción de anticuerpos, los detalles deben tomarse de las publicaciones citadas. En primer lugar se inmunizan animales (por ejemplo conejos) mediante una primera inyección de la proteína diana deseada. Mediante una segunda o tercera inmunización en el plazo de un periodo de tiempo definido (aproximadamente 2-4 semanas tras la inmunización anterior) puede potenciarse la respuesta inmunitaria del animal frente al inmunógeno. A su vez después de diferentes intervalos de tiempo definidos (1^{er} sangrado tras 4 semanas, a continuación aproximadamente cada 2 semanas con en total hasta 5 extracciones) se extrae sangre de los animales y se obtiene de ella un suero inmunitario.

La inmunización de los animales tiene lugar por regla general a través de uno de cuatro procedimientos ampliamente establecidos, estando disponibles también otros procedimientos. A este respecto puede inmunizarse con péptidos, que son específicos para la proteína diana, con toda la proteína o con secuencias parciales extracelulares de una proteína, que puede identificarse experimentalmente o a través de programas predictivos.

(1) En el primer caso se sintetizan péptidos conjugados con KLH (hemocianina de lapa californiana) (longitud: 8-12 aminoácidos) a través de un procedimiento *in vitro* estandarizado y se utilizan estos péptidos para la inmunización. Por regla general tienen lugar 3 inmunizaciones con una concentración de 5-1000 μ g/inmunización. La realización de la inmunización puede tener lugar también como un servicio de proveedores.

(2) Alternativamente, la inmunización puede tener lugar mediante proteínas recombinantes. Para ello se clona el ADN clonado del gen diana en un vector de expresión y se sintetiza la proteína diana de manera análoga a las condiciones del respectivo fabricante (por ejemplo Roche Diagnostics, Invitrogen, Clontech, Qiagen) por ejemplo sin células *in vitro*, en bacterias (por ejemplo *E. coli*), en levadura (por ejemplo *S. pombe*), en células de insecto o en células de mamífero. Tras la síntesis en uno de los sistemas, se purifica la proteína diana, teniendo lugar a este respecto la purificación por regla general a través de métodos cromatográficos estandarizados. A este respecto también pueden utilizarse proteínas para la inmunización, que dispone de un anclaje molecular como agente auxiliar para la purificación (por ejemplo cola de His, Qiagen; etiqueta de FLAG, Roche Diagnostics; proteínas de fusión Gst). Se encuentra un gran número de protocolos, por ejemplo, en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience.

(3) En el caso de estar disponible una línea celular, que sintetiza la proteína deseada de manera endógena, también puede utilizarse esta línea celular para la producción del antisuero específico. A este respecto, la inmunización tiene lugar en 1-3 inyecciones con en cada caso aproximadamente $1-5 \times 10^7$ células.

(4) La inmunización también puede tener lugar mediante inyección de ADN (inmunización con ADN). Para ello, en primer lugar se clona el gen diana en un vector de expresión, de modo que la secuencia diana está bajo el control de un promotor eucariota fuerte (por ejemplo promotor de CMV). A continuación se transfectan 5-100 μ g de ADN como inmunógeno con una "pistola génica" a zonas capilares con mucho riego sanguíneo de un organismo (por ejemplo ratón, conejo). El ADN transfectado se capta por células del animal, se expresa el gen diana y el animal desarrolla finalmente una respuesta inmunitaria contra el gen diana (Jung *et al.*, Mol Cells 12: 41-49,2001; Kasinrerker *et al.*, Hybrid Hybridomics 21: 287-293, 2002).

Control de calidad del anticuerpo o suero policlonal

Para detectar la especificidad, las más adecuadas son pruebas basadas en cultivo celular con posterior inmunotransferencia de tipo Western (se describen diferentes variaciones, 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, que está bajo el control de un promotor eucariota fuerte (por ejemplo promotor de citomegalovirus). Para la transfección de líneas celulares con ADN están ampliamente establecidos los procedimientos más diversos (por ejemplo electroporación, transfección basada en liposomas, precipitación con fosfato de calcio) (por ejemplo Lemoine *et al.*, Methods Mol. Biol. 75: 441-7, 1997). Alternativamente, también pueden utilizarse líneas celulares, que expresan el gen diana de manera endógena (detección a través de RT-PCR dirigida al gen diana). Para el control se transfectan conjuntamente en el experimento en el caso ideal genes homólogos, para poder detectar en la inmunotransferencia de tipo Western siguiente la especificidad del anticuerpo analizado.

En la inmunotransferencia de tipo Western a continuación se lisan células de cultivo celular o muestras de tejido, que pueden contener la proteína diana, en una disolución de SDS al 1% y a este respecto se desnaturalizan las proteínas. Los lisados se separan electroforéticamente según el tamaño en geles de poliacrilamida de desnaturalización al 8-15% (contienen SDS al 1%) (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, SDS-PAGE). A continuación se transfieren las proteínas mediante uno de varios procedimientos de transferencia (por ejemplo electrotransferencia semiseca; Biorad) a una membrana específica (por ejemplo nitrocelulosa, Schleicher y Schüll). En esta membrana puede hacerse visible la proteína deseada. Para ello se incuba en primer lugar la membrana con el anticuerpo, que reconoce la proteína diana (dilución de aproximadamente 1:20-1:200, según la especificidad del anticuerpo), durante 60 minutos. Tras una etapa de lavado se incuba la membrana con un segundo anticuerpo, acoplado con un marcador (por ejemplo enzimas tales como peroxidasa o fosfatasa alcalina), que reconoce el primer anticuerpo. En una reacción colorimétrica o quimioluminiscente puede hacerse visible a continuación la proteína diana sobre la membrana (por ejemplo ECL, Amersham Bioscience). Un anticuerpo con una alta especificidad para la proteína diana debe reconocer en el caso ideal solo la propia proteína deseada.

Para confirmar la ubicación de membrana identificada en la mezcla básica *in silico* de la proteína diana se utilizan diferentes procedimientos. Un procedimiento importante y ampliamente establecido que utiliza los anticuerpos descritos anteriormente es la inmunofluorescencia (IF). Para ello se utilizan células de líneas celulares establecidas, que o bien sintetizan la proteína diana (detección del ARN en la RT-PCR o de la proteína en la inmunotransferencia de tipo Western) o bien se han transfectado con ADN de plásmido. Para la transfección de líneas celulares con ADN están ampliamente establecidos los procedimientos más diversos (por ejemplo electroporación, transfección basada en liposomas, precipitación con fosfato de calcio) (por ejemplo Lemoine *et al.*, Methods Mol. Biol. 75: 441-7, 1997). El plásmido transfectado en las células puede codificar en la inmunofluorescencia para la proteína no modificada o también acoplar diferentes marcadores de aminoácidos a la proteína diana. Los marcadores más importantes son, por ejemplo, la "proteína verde fluorescente" (GFP) en sus diferentes formas que fluorescen de manera diferencial, secuencias peptídicas cortas de 6-12 aminoácidos, para las que están disponibles anticuerpos con alta afinidad y específicos, o la secuencia de aminoácidos corta Cys-Cys-X-Cys-Cys, que puede unirse a través de sus cisteínas a sustancias fluorescentes específicas (Invitrogen). Las células, que sintetizan la proteína diana, se fijan por ejemplo con paraformaldehído o metanol. A continuación pueden permeabilizarse las células en caso necesario mediante la incubación con detergentes (por ejemplo Triton X-100 al 0,2%). A continuación se incuban las células con un anticuerpo primario, que está dirigido contra la proteína diana o contra uno de los marcadores acoplados. Tras una etapa de lavado se incuba la mezcla básica con un segundo anticuerpo, acoplado con un marcador fluorescente (por ejemplo fluoresceína, Texas Red, Dako), que se une al primer anticuerpo. A continuación se recubren las células así marcadas con glicerina y se analizan con ayuda de un microscopio de fluorescencia según las instrucciones del fabricante. A este respecto se consiguen emisiones de fluorescencia específicas, en función de las sustancias utilizadas, mediante una excitación específica. El análisis permite por regla general la localización segura de la proteína diana, tiñéndose para la confirmación de la calidad del anticuerpo y de la proteína diana en tinciones dobles además de la proteína diana también los marcadores de aminoácidos acoplados u otras proteínas marcadoras, cuya localización ya se describe en la bibliografía. Un caso especial lo representa la GFP y sus derivados, que pueden excitarse directamente y presentan fluorescencia propia. La permeabilidad de membrana, que puede controlarse mediante la utilización de detergentes, permite detectar en la inmunofluorescencia si un epítipo inmunogénico está localizado dentro o fuera de la célula. La predicción de las proteínas seleccionadas puede corroborarse así experimentalmente. Alternativamente, la detección de dominios extracelulares puede tener lugar por medio de citometría de flujo. Para ello se fijan células en condiciones no permeabilizantes (por ejemplo con PBS/azida de Na/FCS al 2%/EDTA 5 mM) y se analizan en el citómetro de flujo según las instrucciones del fabricante. En este

procedimiento sólo pueden reconocerse epítomos extracelulares del anticuerpo que va a analizarse. A diferencia de la inmunofluorescencia, mediante la utilización de, por ejemplo, yoduro de propidio o azul trípano puede diferenciarse entre células muertas y vivas y con ello pueden evitarse resultados de falso positivo.

5 Purificación por afinidad

La purificación de los sueros policlonales tuvo lugar en el caso de los anticuerpos peptídicos en su totalidad o en el caso de los anticuerpos contra proteínas recombinantes parcialmente como servicio por parte de las empresas contratadas. Para ello, en ambos casos se unió la proteína recombinante o el péptido correspondiente covalentemente a una matriz, se equilibró tras el acoplamiento con un tampón nativo (PBS: solución salina tamponada con fosfato) y a continuación se incubó con el suero en bruto. Tras una etapa de lavado adicional con PBS se eluyó el anticuerpo con glicina 100 mM, pH 2,7 y se neutralizó el eluato inmediatamente en TRIS 2 M, pH 8. Los anticuerpos así purificados pudieron utilizarse entonces para la detección específica de las proteínas diana tanto mediante inmunotransferencia de tipo Western como mediante inmunofluorescencia.

15 Producción de transfectantes de EGFP

Para la microscopía de inmunofluorescencia de antígenos asociados a tumores expresados de manera heteróloga se clonó el ORF completo de los antígenos en vectores pEGFP-C1 y pEGFP-N3 (Clontech). Se transfectaron células CHO y NIH3T3 cultivadas sobre portaobjetos con los constructos de plásmido correspondientes utilizando reactivo de transfección Fugene (Roche) según las instrucciones del fabricante y se analizaron tras 12-24 h por medio de microscopía de inmunofluorescencia.

25 **Ejemplo 1: Identificación de variantes de corte y empalme de claudina-18A1 y claudina-18A2 como dianas de cáncer de diagnóstico y terapéuticas**

El gen de claudina-18 codifica para una molécula de membrana superficial con 4 dominios transmembrana y extremo tanto N- como C-terminal intracelular. Niimi y Kollegen (Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001) describieron dos variantes de corte y empalme de la claudina-18 de ratón y humana, que se describieron como que se expresaban selectivamente en tejido de pulmón (claudina-18A1) o en tejido de estómago (claudina-18A2). Estas variantes se diferencian en el extremo N-terminal (figura 2).

Según la invención se estudió en qué medida podían utilizarse las variantes de corte y empalme claudina-18A2 (SEC ID N°: 7) y claudina-18A1 (SEC ID N°: 117) así como sus respectivos productos de traducción (SEC ID N°: 16 y 118) como marcadores o estructuras diana terapéuticas para tumores. Se estableció una PCR cuantitativa, que puede diferenciar entre ambas variantes, seleccionando pares de cebadores específicos para A1 (SEC ID N°: 109 y 110) o específicos para A2 (SEC ID N° 107 y 108). La variante de corte y empalme A2 se sometió a prueba adicionalmente con un segundo par de cebadores en una PCR convencional (SEC ID N°: 39 y 40). Para la variante A1 se describe que solo es activa en el pulmón normal. Sin embargo, según la invención se determinó sorprendentemente que la variante A1 también es activa en la mucosa estomacal. El estómago y el pulmón son los únicos tejidos normales, que presentan una activación significativa. Todos los demás tejidos normales son negativos para claudina-A1. Durante el estudio de tumores se determinó sorprendentemente que claudina-A1 está fuertemente activada en un gran número de tejidos tumorales. Una expresión especialmente intensa se encuentra en tumores de estómago, tumores de pulmón, carcinomas de páncreas, carcinomas de esófago (figura 3), tumores de la región HNO y carcinomas de próstata. El nivel de expresión de claudina-A1 en tumores de HNO, próstata, páncreas y esófago es 100-10000 veces mayor que el nivel en los tejidos normales correspondientes. Para el estudio de la variante de corte y empalme claudina-A2 se utilizaron oligonucleótidos, que permiten específicamente la amplificación de este transcrito (SEC ID N°: 39 y 40 ó 107 y 108). El estudio dio como resultado que la variante de corte y empalme A2 no se expresa en ninguno de los más de 20 tejidos normales estudiados excepto en la mucosa estomacal y en menor medida también tejido de testículo. Se determinó que, como la variante A1, también la variante A2 está activada en muchos tumores (representado a modo de ejemplo en la figura 4). A estos pertenecen los tumores de estómago (8/10), tumores de páncreas (6/6), carcinomas de esófago (5/10) y carcinomas de hígado. Aunque en el pulmón sano no puede detectarse ninguna activación de claudina-18A2, se determinó sorprendentemente que una parte de los tumores de pulmón expresan la variante de corte y empalme A2.1.

55 Tabla 1A. Expresión de claudina-18A2 en tejidos normales y tumorales

Tejido normal	Expresión	Tipo de tumor	Expresión
Cerebro	-	Carcinoma de colon	-
Cerebelo	-	Carcinoma de páncreas	++
Miocardio	-	Carcinoma de esófago	++
Músculo esquelético	-	Carcinoma de estómago	+++
Endometrio	-	Carcinoma bronquial	++
Estómago	+++	Carcinoma de mama	-
Colon (intestino grueso)	-	Carcinoma de ovario	-

Páncreas	-
Riñón	-
Hígado	-
Testículos	+
Timo	-
Mama	-
Ovario	-
Útero	-
Piel	-
Pulmón	-
Tiroides	-
Ganglios linfáticos	-
Bazo	-
PBMC	-
Esófago	-

Carcinoma de endometrio	n.e.
Tumores de HNO	++
Carcinoma de riñón	-
Carcinoma de próstata	-

Tabla 1B. Expresión de claudina-18A1 en tejidos normales y tumorales

Tejido normal	Expresión
Cerebro	-
Cerebelo	-
Miocardio	-
Músculo esquelético	-
Endometrio	-
Estómago	+++
Colon (intestino grueso)	-
Páncreas	-
Riñón	-
Hígado	-
Testículos	+
Timo	-
Mama	-
Ovario	-
Útero	-
Piel	-
Pulmón	+++
Tiroides	-
Ganglios linfáticos	-
Bazo	-
PBMC	-
Esófago	-

Tipo de tumor	Expresión
Carcinoma de colon	-
Carcinoma de páncreas	++
Carcinoma de esófago	++
Carcinoma de estómago	+++
Carcinoma bronquial	++
Carcinoma de mama	+
Carcinoma de ovario	n.e.
Carcinoma de endometrio	n.e.
Tumores de HNO	++
Carcinoma de riñón	-
Carcinoma de próstata	++

5 También la PCR convencional como estudio de control independiente confirmó los resultados de la PCR cuantitativa. Para ello se utilizaron oligonucleótidos (SEC ID N°: 39, 40), que permiten una amplificación específica de la variante de corte y empalme A2. Según la invención se mostró que 8/10 carcinomas de estómago y la mitad de los carcinomas de páncreas sometidos a prueba presentan una fuerte expresión de esta variante de corte y empalme (figura 1). Por el contrario, no puede detectarse una expresión con PCR convencional en otros tejidos. En particular no se encuentra expresión en el pulmón, el hígado, la sangre, los ganglios linfáticos, tejido de mama y tejido renal (tabla 1). Así, las variantes de corte y empalme según la invención representan marcadores moleculares altamente específicos para tumores del tubo digestivo superior así como tumores de pulmón, tumores de HNO, carcinoma de próstata y sus metástasis. Estos marcadores moleculares pueden utilizarse según la invención para detectar células tumorales. La detección de los tumores puede tener lugar según la invención con dichos oligonucleótidos (SEC ID N°: 39, 40, 107-110). Como oligonucleótidos son adecuados en particular pares de cebadores, de los que al menos uno se une en condiciones rigurosas a un fragmento de 180 pares de base de longitud del transcrito, que es específico para la una (SEC ID N°: 8) o la otra variante de corte y empalme (SEC ID N°: 119).

20 Para confirmar estos datos a nivel proteico, se generaron anticuerpos específicos para claudina o inmunoseros mediante la inmunización de animales. A través del análisis de los dominios transmembrana con herramientas bioinformáticas (TMHMM, TMPRED) y estudios de inmunofluorescencia de células, que expresan proteínas de fusión de claudina-18 etiquetadas con GFP potenciada, se confirmó la localización en la membrana plasmática de claudina-18 y la topología proteica. La claudina-18 presenta dos dominios extracelulares. Los dominios extracelulares N-terminales se diferencian en la secuencia en ambas variantes de corte y empalme (SEC ID N°: 111

para A1 y SEC ID N°: 112 para A2). El dominio extracelular C-terminal es idéntico para ambas variantes (SEC ID N°: 137). Hasta la fecha no se ha descrito ningún anticuerpo, que se una a los dominios extracelulares de claudina-18. Según la invención, para la inmunización se seleccionaron epítopos peptídicos localizados extracelularmente, que son específicos para la variante A1 o A2 o aparecen en ambas variantes. Ninguna de las variantes de claudina-18 presenta motivos de glicosilación clásicos y por tanto no era de esperar una glicosilación de la proteína. A pesar de ello, en la selección de los epítopos se tuvo en cuenta que los epítopos que contienen asparagina, serina, treonina en casos poco frecuentes también presentan potencial de glicosilación sin sitios de glicosilación clásicos. La glicosilación de un epítipo puede impedir la unión de un anticuerpo específico para este epítipo. Según la invención se seleccionaron, entre otros, epítopos de tal manera que los anticuerpos generados con ello permiten una diferenciación del estado de glicosilación del antígeno.

Entre otros, para la inmunización se seleccionaron los siguientes péptidos para la producción de anticuerpos:

SEC ID N°: 17: DQWSTQDLYN (dominio extracelular N-terminal, específico para A2, unión independiente de la glicosilación)

SEC ID N°: 18: NNPVTAVFNYQ (dominio extracelular N-terminal, específico para A2, unión principalmente a la forma no glicosilada, N37)

SEC ID N°: 113: STQDLYNNPVTAVF (dominio extracelular N-terminal, específico para A2, unión solo a la forma no glicosilada, N37)

SEC ID N°: 114: DMWSTQDLYDNP (dominio extracelular N-terminal, específico para A1)

SEC ID N°: 115: CRPYFTILGLPA (dominio extracelular N-terminal, específico principalmente para A1)

SEC ID N°: 116: TNFWMSTANMYTG (dominio extracelular C-terminal, reconoce tanto A1 como A2).

A modo de ejemplo se exponen los datos para el anticuerpo específico para A2, que se produjo mediante la inmunización con SEC ID N°: 17. El anticuerpo específico puede utilizarse en diferentes condiciones de fijación para estudios de inmunofluorescencia. En el caso de tinciones comparativas de líneas celulares positivas así como negativas en la RT-PCR, la proteína correspondiente puede detectarse en una cantidad que puede detectarse fácilmente específicamente en las líneas celulares de carcinoma de estómago tipificadas como positivas (figura 5). La proteína endógena está localizada en la membrana y forma agregados focales mayores en la membrana. Este anticuerpo se utilizó por lo demás para una detección de proteínas en la inmunotransferencia de tipo Western. Como era de esperar, la proteína únicamente se detecta en el estómago y en ningún otro tejido normal, tampoco en el pulmón (figura 9). En el caso de la tinción comparativa de tumores de estómago y tejido de estómago normal adyacente de pacientes, se descubrió sorprendentemente que en todos los tumores de estómago en los que se detecta claudina-18 A2, esta proteína presenta una masa menor (figura 10, izquierda). En una serie de experimentos se estableció según la invención, que también se obtiene como resultado una banda a esta altura cuando se trata lisado de tejido de estómago normal con el agente de desglicosilación PNGasa F (figura 10, derecha). Mientras que en todos los tejidos de estómago normales puede detectarse exclusivamente la forma glicosilada de la variante A2, A2 puede detectarse como tal en más del 60% de los carcinomas de estómago estudiados y concretamente de manera exclusiva en la forma desglicosilada. Aunque la variante A2 de claudina-18 en pulmón normal tampoco se detecta a nivel de proteínas, ya se encuentra en la RT-PCR cuantitativa en carcinomas bronquiales. También en este caso únicamente está presente la variante desglicosilada (figura 11). Según la invención se han producido anticuerpos, que reconocen el dominio extracelular de la variante de corte y empalme claudina-18-A2. Por lo demás se produjeron anticuerpos, que reconocen selectivamente el dominio N-terminal de la variante de corte y empalme claudina-18-A1 (figura 8) o anticuerpos, que se unen a ambas variantes en la región del dominio extracelular C-terminal (figura 7). Según la invención tales anticuerpos pueden utilizarse para fines de diagnóstico por ejemplo inmunohistología (figura 12) pero también para fines terapéuticos tal como se explicó anteriormente. Un aspecto importante adicional se refiere a dominios glicosilados de manera diferencial de claudina-18. Según la invención se produjeron anticuerpos, que se unen exclusivamente a epítopos no glicosilados. La propia claudina-18 es un antígeno de diferenciación muy selectivo de tejido de estómago (A2) o de pulmón y estómago (A1). Dado que evidentemente se ve afectada por variaciones de la maquinaria de glicosilación en tumores, se genera en tumores una variante especial de A2, que está desglicosilada. Esto puede utilizarse desde el punto de vista del diagnóstico así como terapéutico. Los inmunosueros, como el descrito en este caso (contra el péptido SEC ID N°: 17) pueden utilizarse desde el punto de vista del diagnóstico por ejemplo en la inmunotransferencia de tipo Western. Los anticuerpos, que no pueden unirse en absoluto al epítipo glicosilado, como por ejemplo los obtenidos mediante inmunización con el péptido SEC ID N°: 113 (figura 6), pueden diferenciarse en la unión a tejido tumoral y a tejido normal. En particular tales anticuerpos pueden utilizarse terapéuticamente, dado que son altamente selectivos. Los anticuerpos producidos pueden utilizarse también directamente para la producción de anticuerpos quiméricos o humanizados recombinantes. Esto también puede tener lugar directamente con anticuerpos, que se obtuvieron de conejo (véase a este respecto J Biol Chem. 5 de mayo de 2000;275(18):13668-76 de Rader C, Ritter G, Nathan S, Elia M, Gout I, Jungbluth AA, Cohen LS, Welt S, Old LJ, Barbas CF 3rd. "The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies"). Para ello se guardaron linfocitos de los animales

inmunizados. También para procedimientos inmunoterapéuticos tales como vacunas o la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos para antígeno, los aminoácidos 1-47 (SEC ID N°: 19 y 120) representan epítopos especialmente buenos.

5 **Listado de secuencias**

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG
 Sahin Dr., Ugur
 Tureci Dr., Özlem
 10 Koslowski Dr., Michael

<120> Productos génicos expresados de manera diferencial en tumores y utilización de los mismos.

<130> 342-4 EPT20

<150> DE 102 54 601.0

<151> 2002-11-22

<160> 23

<170> Patentin versión 3.1

<210> 7

<211> 786

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

atggcctgga ctgcctgtca gggcttgggg ttctgtggtt cactgattgg gattgctggc 60
atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtataa caaccccgta 120
acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tcogagagag ctctggcttc 180
accgagtgcc ggggctactt caccctgctg gggetgccag ccatgctgca ggcagtgcga 240
gccctgatga tcgtaggcat cgctcctgggt gccattggcc tcctggatc catctttgcc 300
ctgaaatgca tccgattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc 360
tccgggatca tgttcattgt ctcaggtctt tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420
aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg 480
atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca tttggtgctg ctctgttcgt gggctgggtc 540
gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tcgcctgccg gggcctggca 600
ccagaagaaa ccaactataa agccgtttct tatcatgcct caggccacag tgttgccctac 660
aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc tttgggtcca acacaaaaa caagaagata 720
tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttccaa gcacgactat 780
gtgtaa 786
    
```

<210> 8

<211> 180

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 583 754 T3

<400> 8
 tgcgccacca tggccgtgac tgccctgtcag ggcttgggggt tcgtggtttc actgattggg 60
 attgcggggca tcattgctgc cacctgcatg gaccagtgga gcaccaaga cttgtacaac 120
 aaccccgtaa cagctgtttt caactaccag gggctgtggc gctcctgtgt ccgagagagc 180

5 <210> 16
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
 1 5 10 15
 Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20 25 30
 Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35 40 45
 Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60

10

ES 2 583 754 T3

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
260

5 <210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 17
Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn
1 5 10

15 <210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
ggttcgtggt ttcactgatt gggattgc **28**

<210> 40

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 40
cggttttcta gttggtttct tctgggtg **27**

<210> 107

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 107
tgttttcaac taccaggggc **20**

<210> 108

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 108
tgttggcttt ggcagagtcc **20**

<210> 109

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 109
gaggcagagt tcaggctca ccga 24

<210> 110

5 **<211> 20**

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 **<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido**

ES 2 583 754 T3

<400> 110
 tgttggcttt ggcagagtcc 20

5 <210> 111
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val
 1 5 10 15

Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln
 20 25 30

Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu
 35 40 45

10 Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 50 55

<210> 112
 <211> 53
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 112
 Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val
 1 5 10 15

Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly
 20 25 30

Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met
 35 40 45

Leu Gln Ala Val Arg
 50

20 <210> 113
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 113
 Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
 1 5 10

<210> 114
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 114
 Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro
 1 5 10

35 <210> 115
 <211> 12

ES 2 583 754 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115
Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116
Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly
1 5 10

<210> 117
<211> 816
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 117
gccaggatca tgtccaccac cacatgccaa gtggtggcgt tcctcctgtc catcctgggg 60
ctggccgget gcacgcggc caccgggatg gacatgtgga gcaccagga cctgtacgac 120
aaccocgtca cctccgtgtt ccagtaacaa gggctctgga ggagctgcgt gaggcagagt 180
tcaggcttca ccgaatgcag gccctatttc accatcctgg gacttcagc catgctgcag 240
gcagtgcgag coctgatgat cgtaggcadc gtccctgggtg ccattggcct cctggtatcc 300
atctttgccc tgaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgcaa agccaacatg 360
acactgacct ccgggatcat gttcattgtc tcaggctctt gtgcaattgc tggagtgtct 420
gtggttgcca acatgctggt gactaacttc tggatgtcca cagctaacat gtacaccggc 480
atgggtggga tgggtgcagac tgttcagacc aggtacacat ttggtgcggc tctgttcgtg 540
ggctgggtcg ctggaggcct cacactaatt ggggggtgta tgatgtgcat cgccctgccgg 600
ggocctggcac cagaagaaac caactacaaa gccgtttctt atcatgcctc aggccacagt 660
gttgccctaca agcctggagg cttcaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccaaaaac 720
aagaagatat acgatggagg tgcccgcaca gaggacgagg tacaatctta tccttccaag 780
cacgactatg tgtaatgctc taagacctct cagcac 816

<210> 118
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 583 754 T3

<400> 118

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
 20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
 100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
 115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
 260

ES 2 583 754 T3

<210> 119
 <211> 227
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<400> 119
 gccaggatca tgtccaccac cacatgccaa gtggtggeggt tcctcctgtc catcctgggg 60
 ctggccggct gcatcgcggc caccgggatg gacatgtgga gcacccagga cctgtacgac 120
 aaccccgtca cctccgtggt ccagtacgaa gggctctgga ggagctgcgt gaggcagagt 180
 tcaggcttca ccgaatgcag gccctatttc accatcctgg gacttcc 227

10 <210> 120
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 120
 Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu
 1 5 10 15
 Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
 20 25 30
 Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly
 35 40 45
 Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60
 Pro Tyr Phe Thr Ile
 65

20 <210> 137
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 137
 Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr
 1 5 10 15
 Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly
 20 25 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo, que se une específicamente a una proteína o a un polipéptido, que es codificado(a) por un ácido nucleico según SEC ID N°: 7 u 8, para su utilización en un procedimiento diagnóstico o terapéutico, comprendiendo el procedimiento diagnóstico la administración del anticuerpo y estando el anticuerpo del procedimiento diagnóstico acoplado con un agente de diagnóstico.
- 10 2. Anticuerpo para su utilización según la reivindicación 1, en el que la utilización diagnóstica o terapéutica comprende un diagnóstico o tratamiento de una enfermedad cancerosa, siendo la enfermedad cancerosa un tumor de páncreas, un tumor de esófago, un tumor de pulmón o un tumor de hígado.
- 15 3. Anticuerpo para su utilización según la reivindicación 1 o 2, que puede obtenerse mediante inmunización con un péptido o polipéptido con una secuencia de aminoácidos, que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 16-19, 112 y 113.
- 20 4. Anticuerpo para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
5. Anticuerpo para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo.
- 25 6. Anticuerpo para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo está acoplado con un agente terapéutico.
7. Anticuerpo para su utilización según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo se utiliza en un procedimiento de tratamiento, y en el que el procedimiento comprende la administración del anticuerpo.
- 30 8. Anticuerpo para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína o el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos, que se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEC ID N°: 16-19, 112 y 113.

Figura 1

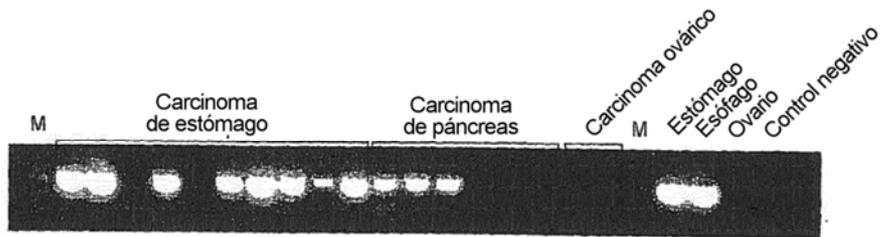
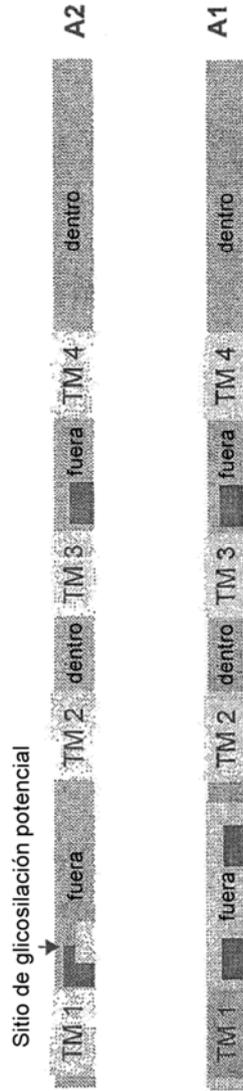


Figura 2



Sitios de glicosilación predichos (posiciones de aminoácido)

Variante de estómago				Variante de pulmón			
Nombre de secuencia	Posición	Potencial	Acuerdo de evaluación	Nombre de secuencia	Posición	Potencial	Acuerdo de evaluación
Secuencia	37		0.7219 (9/9)	Secuencia	38		0.7102 (9/9)
Secuencia	38		0.6502 (8/9)	Secuencia	116		0.5713 (7/9)
Secuencia	45		0.6026 (8/9)	Secuencia	141		0.6347 (7/9)
Secuencia	116		0.5713 (7/9)	Secuencia	146		0.5186 (6/9)
Secuencia	141		0.6348 (7/9)	Secuencia	153		0.4696 (5/9)
Secuencia	146		0.5187 (6/9)	Secuencia	205		0.6009 (8/9)
Secuencia	153		0.4696 (5/9)	Secuencia	234		0.3956 (8/9)
Secuencia	205		0.6011 (8/9)	Secuencia	237		0.4603 (6/9)
Secuencia	234		0.3960 (8/9)				
Secuencia	237		0.4602 (6/9)				

Nombre de secuencia	Posición	Potencial	Acuerdo de evaluación	Resultado de N-glicosilación
Secuencia	37		0.7219 (9/9)	++
Secuencia	38		0.6502 (8/9)	+
Secuencia	45		0.6026 (8/9)	+
Secuencia	116		0.5713 (7/9)	+
Secuencia	141		0.6348 (7/9)	+
Secuencia	146		0.5187 (6/9)	+
Secuencia	153		0.4696 (5/9)	-
Secuencia	205		0.6011 (8/9)	+
Secuencia	234		0.3960 (8/9)	-
Secuencia	237		0.4602 (6/9)	-

Figura 3

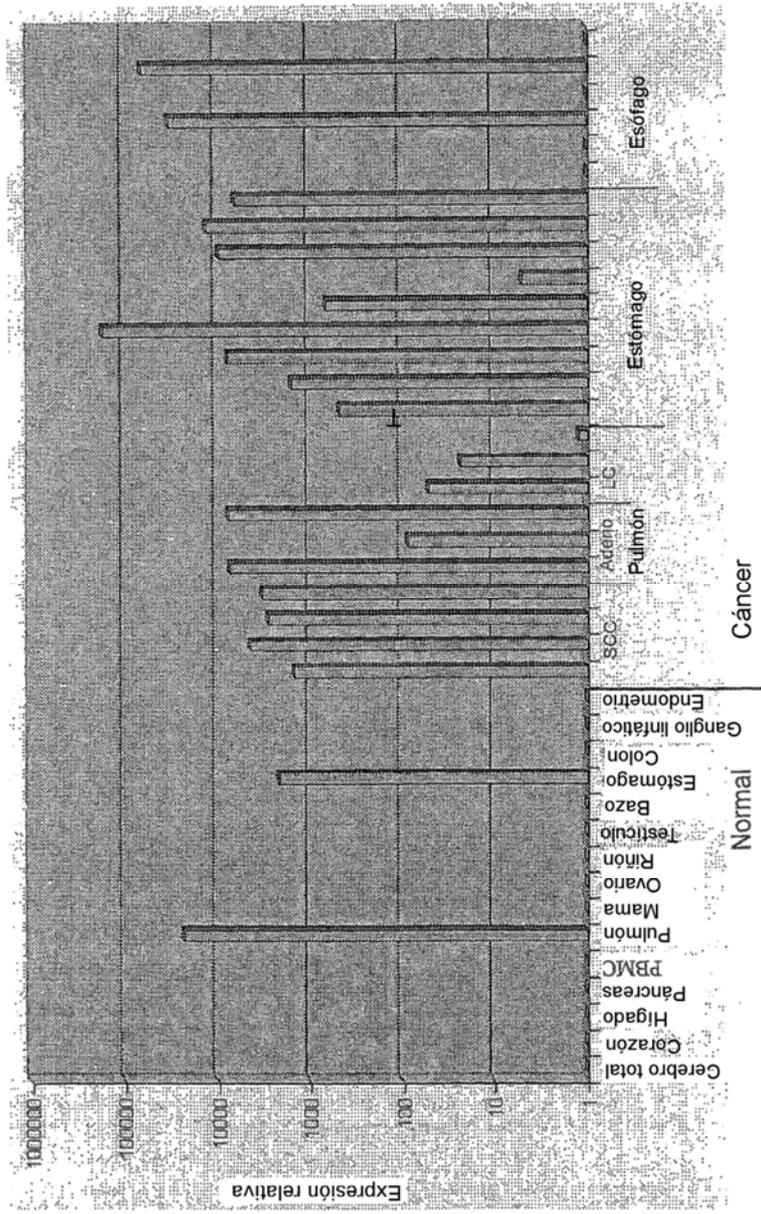


Figura 4

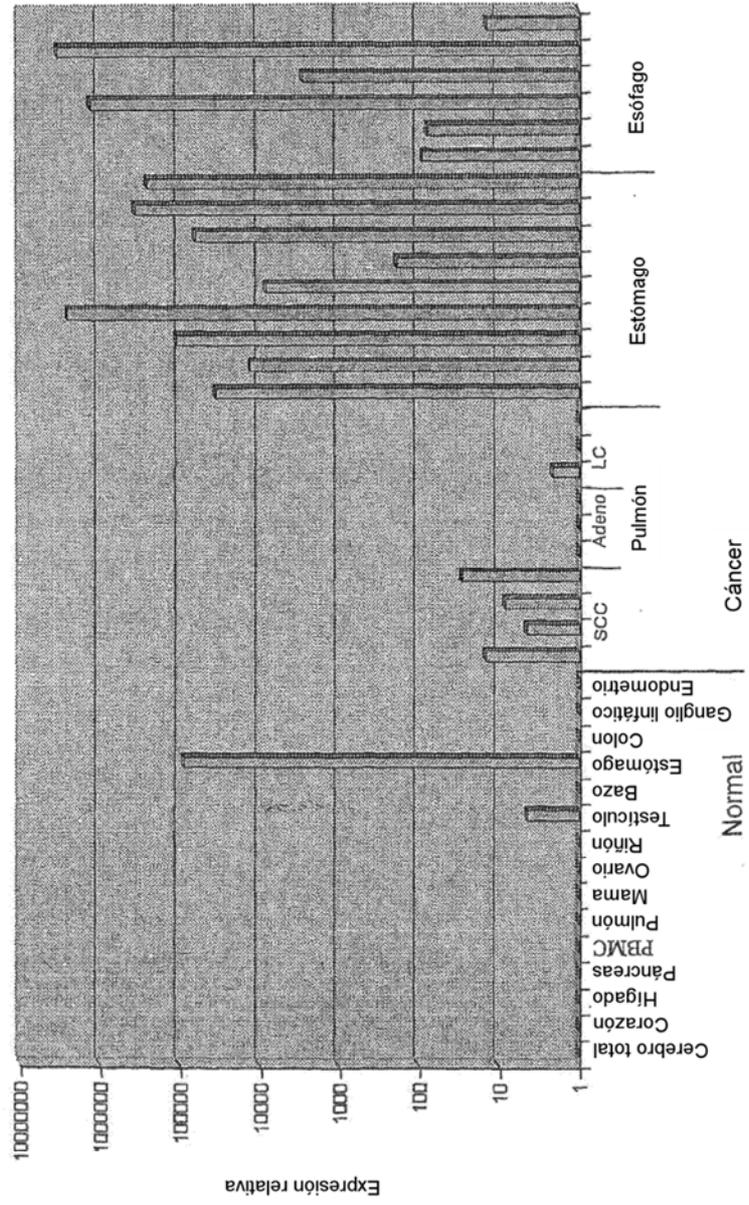
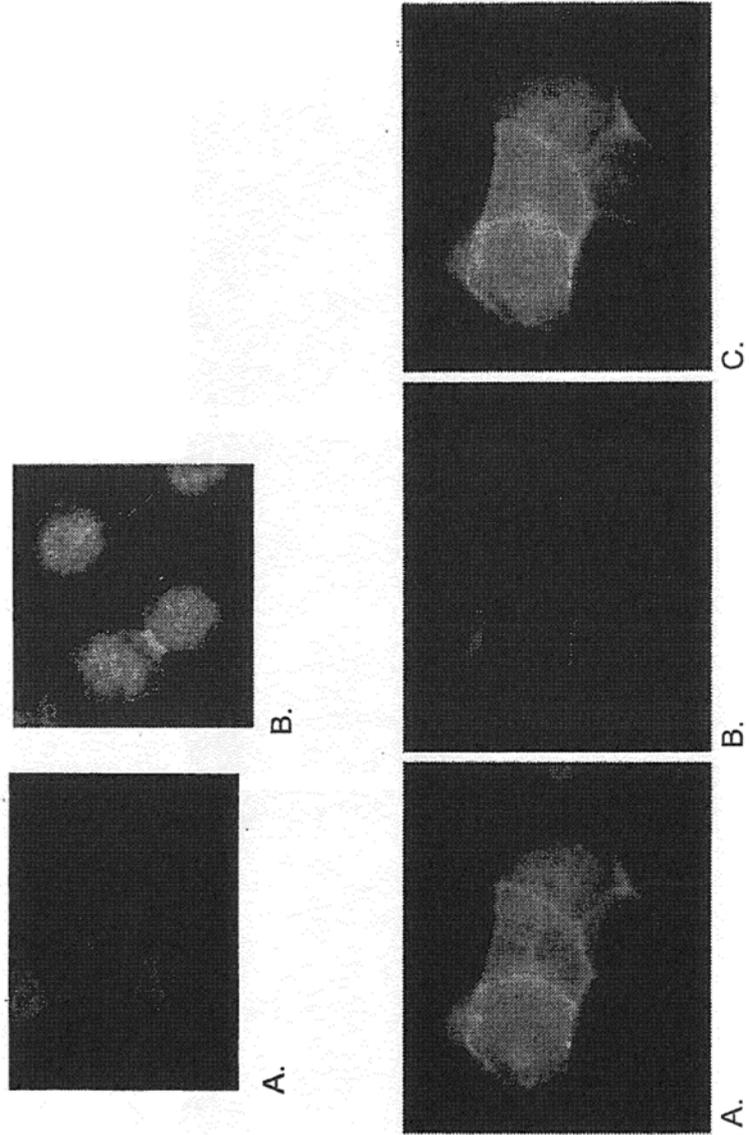


Figura 5



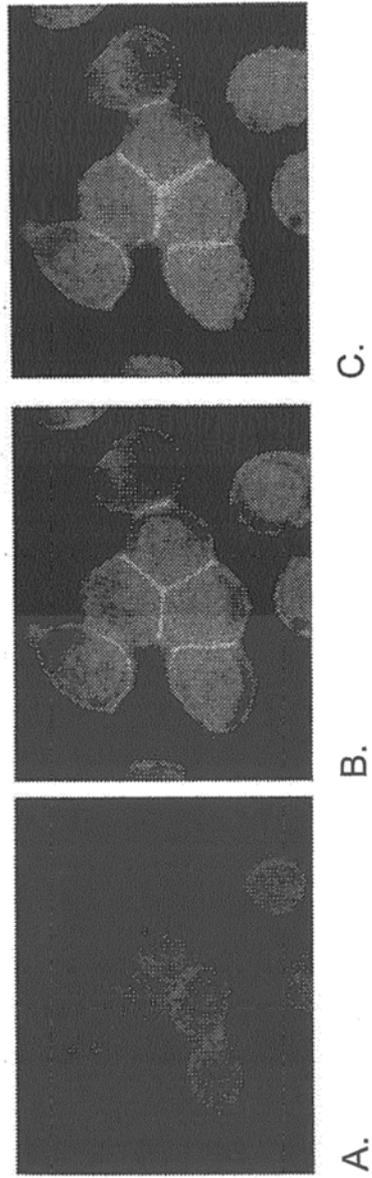


Figura 6

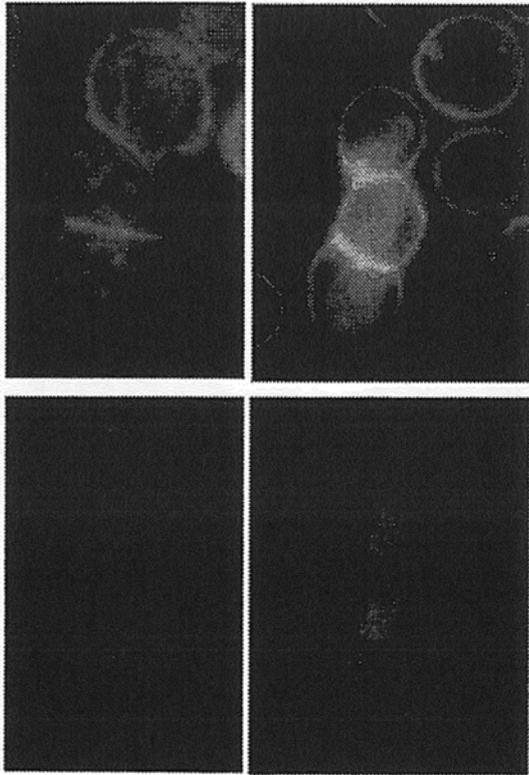
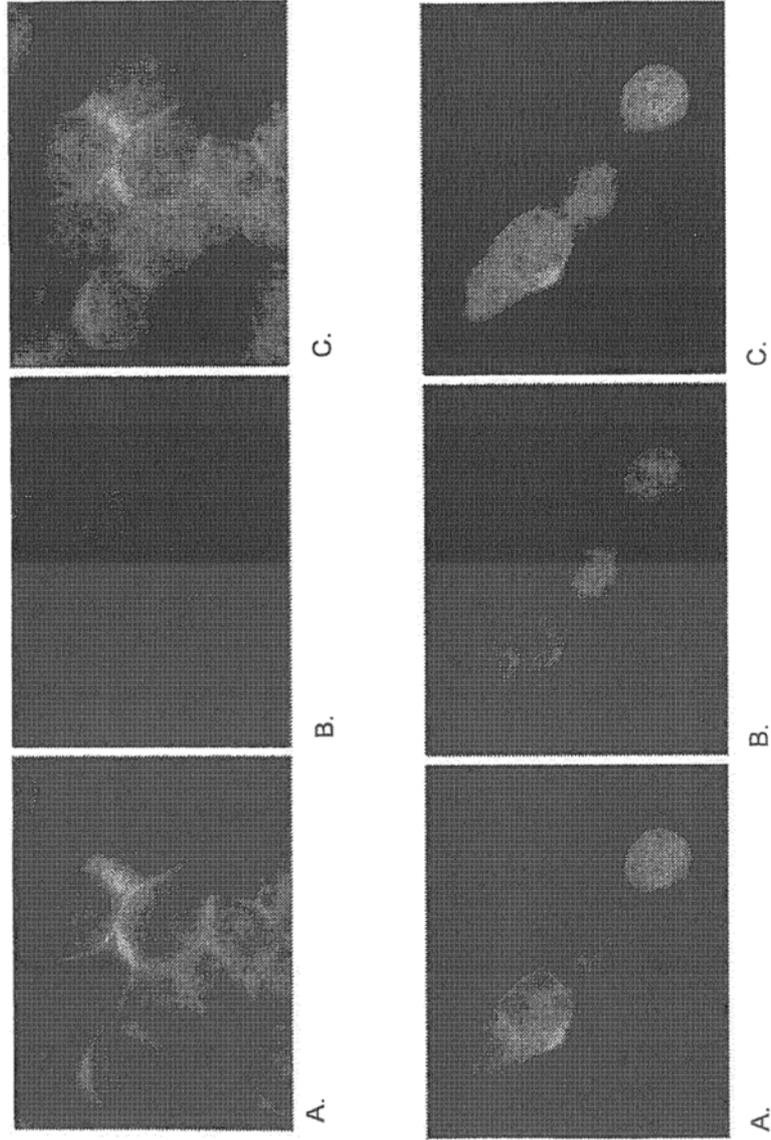


Figura 7

Figura 8



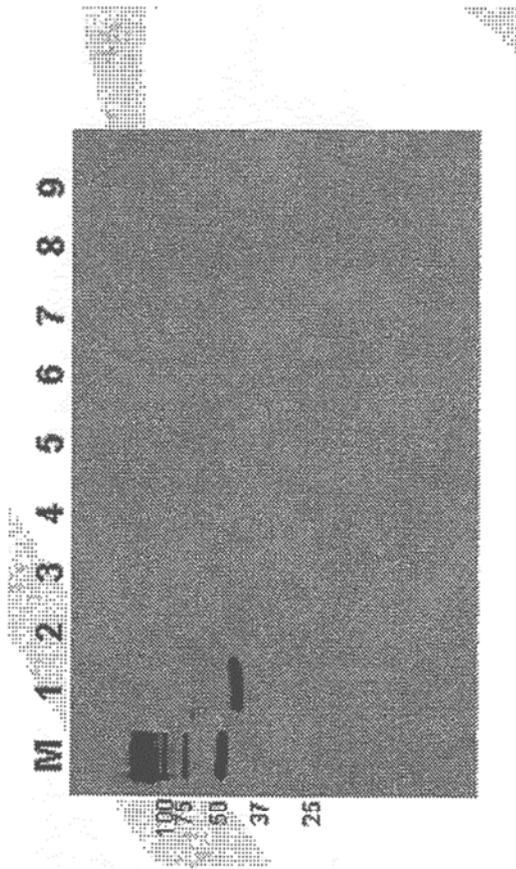


Figura 9

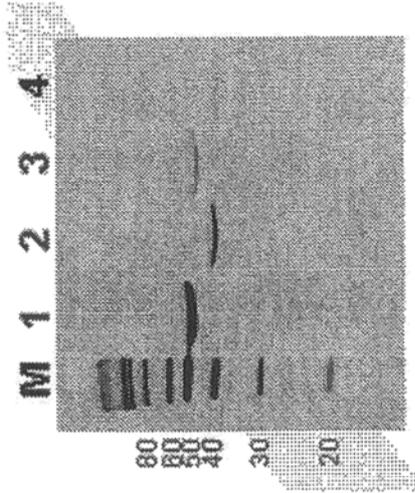
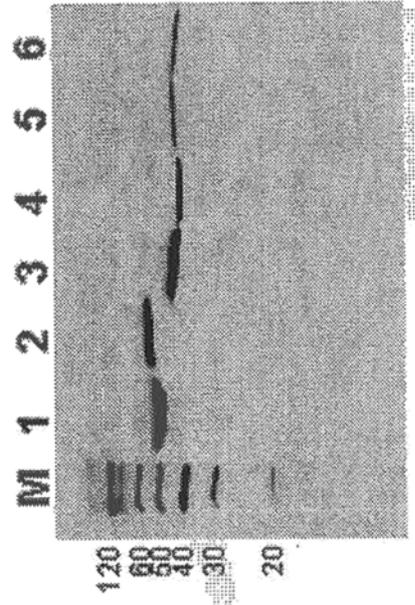
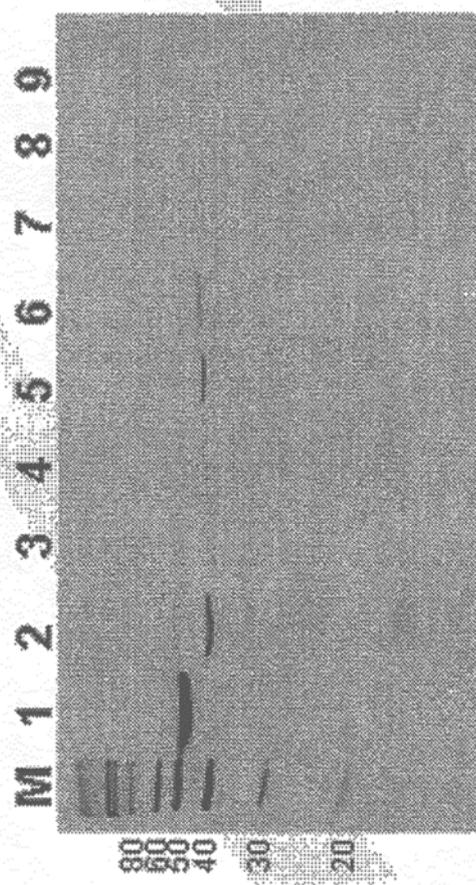


Figura 10

Figura 11



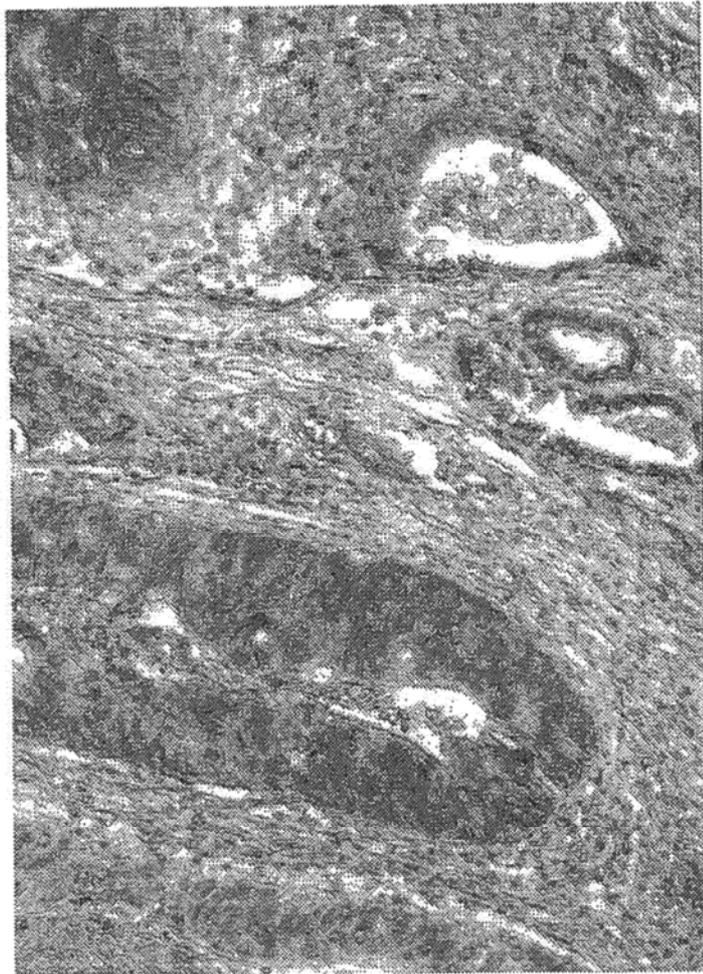
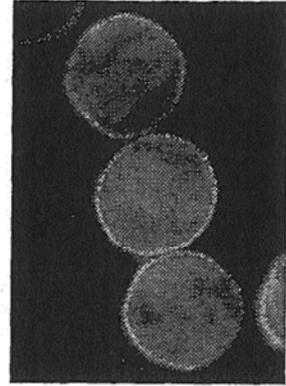
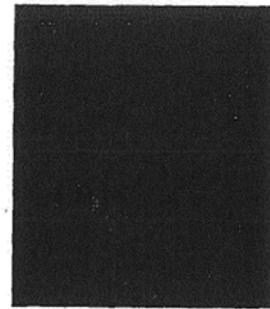


Figura 12

Figure 13



B.



A.

Figura 14

ID	Secuencia
#7	ATGGCCGTGACTGCCTGTGAGGGCTTGGGGTTCGTGGTTTCACTGATTGGGATTGCGGGCATCATTGCTG CCACCTGCATGGACCAAGTGGAGCACCAAGACTTGTACAACAACCCGTAACAGCTGTTTTCAACTACCA GGGGCTGTGGCGCTCCTGTGTCCGAGAGAGCTCTGGCTTACCCAGTGGCGGGGCTACTTACCCTGCTG GGGCTGCCAGCCATGCTGCAGGCAGTGCAGCCCTGATGATCGTAGGCATCGTCTGGGTGCCATTGGCC TCCTGGTATCCATCTTTGCCCTGAAATGCATCCGCATTGGCAGCATGGAGGACTCTGCCAAAGCCAACAT GACACTGACCTCCGGGATCATGTTTCATGCTCAGGCTTTGTGCAATTGCTGGAGTGTCTGTGTTGCC AACATGCTGGTGACTAACTTCTGGATGTCCACAGCTAACATGTACACCGGCATGGTGGGATGGTGCAGA CTGTTTACAGCAGGTACACATTTGGTGCAGCTCTGTTCGTGGGCTGGGTCGTGGAGGCCTCACACTAAT TGGGGTGTGATGATGTGCATGCCTGCCGGGGCTGGCACCAGAAGAAACCAACTACAAGCCGTTTCT TATCATGCCTCAGCCACAGTGTTCCTACAAGCCTGGAGGCTTCAAGCCAGCACTGGCTTTGGGTCCA ACACCAAAAACAAGAAGATATACGATGGAGGTGCCCGCACAGAGGACGAGGTACAATCTTATCCTTCCAA GCACGACTATGTGTA
#8	tggccaccatggccgtgactgcctgtcagggcttggggcttctggtttcactgattggg attcgggcatcattgctgccacctgcatggaccagtgagcaccacaagacttgtaaac aaccctgaacagctgttttcaactaccagggctgtggcgctcctgtgtccgagagagc
#16	MAVTACQGLGFVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLL GLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSI FALKCIRIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFA NMLVTNFWMSTANMYTGMGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVS YHSGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKPKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDIY*
#17	DQWSTQDLYN
#18	NNPVTAVFNYQ
#19	MAVTACQGLGFVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQ
#39	GGTTCGTGGTTTCACTGATTGGGATTGC
#40	CGGCTTTGTAGTTGGTTCTTCTGGTG
#107	TGTTTTCAACTACCAGGGC
#108	TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC
#109	GAGGCAGAGTTCAGGCTTCACCGA
#110	TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC
#111	TGMDMWSTQDLYDNPVTSVFQYEGLRSCVRQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVR
#112	DQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLL GLPAMLQAVR
#113	STQDLYNNPVTAVF
#114	DMWSTQDLYDNP
#115	CRPYFTILGLPA
#116	TNFWMSTANMYTG
#117	gccaggatca tgtccaccac cacatgcaa gtgggtggcgt tectcctgct cactctggg ctggccgct gcatcgggc caccgggatg gacatgtgga gcaccagga cctgtacgac

	<p>aaccccgta cctccgtgt ccagtacga gggctctgga ggagctcgt gaggcagat tcaggcttca ccgaatgcag gccctatttc accatcctgg gacttccagc catgctgcag gcagtgcgag ccctgatgat cgtaggcattc gtcctgggtg ccattggcct cctggtatcc atctttgcc tgaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgcaa agccaacatg aacttgacct ccgggatcat gttcattgtc tcaggtcttt gtgcaattgc tggagtgtct gtgtttgcca acatgctggt gactaacttc tggatgtcca cagctaacat gtacaccggc atgggtggga tgggtcgagc tgttcagacc aggtacacat ttgggtcggc tctgttcgtg ggctgggtcg ctggaggcct cacactaatt ggggggtgta tgatgtgcat cgcctgccgg ggctggcac cagaagaac caactacaaa gccgtttctt atcatgcctc aggccacagt gttgcctaca agcctggagg cttcaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccaaaaac aagaagatat acgatggagg tgcccgcaca gaggacgagg tacaatctta tccttccaag cacgactatg tgtaatgctc taagacctct cagcac</p>
#118	<p>MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVF QYEWLRSCVRQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSI FALK CIRIGMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTFWMSANMYTGMGG MVQTVQTRYTFGAALFVGVVAGGLTLIGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSV AYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHBYV</p>
#119	<p>gccaggatca tgtccaccac cacatgcaa gtgggtggct tcctcctgtc catcctggg ctggccgct gcatcgggc caccgggatg gacatgtgga gcaccagga cctgtacgac aaccccgta cctccgtgt ccagtacga gggctctgga ggagctcgt gaggcagat tcaggcttca ccgaatgcag gccctatttc accatcctgg gacttcc</p>
#120	<p>MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVFQYEWLRSCVRQSSGFTECRPYFTI</p>
#137	<p>NMLVTFWMSANMYTGMGMVQTVQTRYTFG</p>