(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 627 962**

(51) Int. CI.:

C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2005 E 11002017 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2380903**

(54) Título: **Productos génicos de expresión diferencial en tumores y su uso**

(30) Prioridad:

18.05.2004 DE 102004024617

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

TÜRECI, ÖZLEM;
SAHIN, UGUR;
KOSLOWSKI, MICHAEL;
FRITZ, STEFAN y
GEPPERT, HARALD-GERHARD

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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 de expresión diferencial en tumores y su uso

Pese a los enfoques interdisciplinarios y al agotamiento de las modalidades de terapia clásicas, las enfermedades de cáncer siguen siendo una de las principales causas de muerte. Los conceptos terapéuticos más recientes tienen como objetivo incluir el sistema inmunitario propio del paciente en el concepto terapéutico general utilizando vacunas tumorales recombinantes y otros procedimientos específicos, como la terapia con anticuerpos. La condición para que una estrategia de este tipo sea satisfactoria es el reconocimiento de los antígenos específicos de un tumor o asociados a un tumor, o epítopos, por el sistema inmunitario del paciente, cuyas funciones efectoras se deben reforzar de forma intervencional. Las células tumorales presentan una diferencia biológica esencial de sus células de origen no malignas. Estas diferencias están causadas por las modificaciones genéticas adquiridas durante el desarrollo del tumor y también dan lugar a, entre otros, la formación de estructuras moleculares modificadas cualitativa o cuantitativamente en las células cancerosas. Si las estructuras de este tipo asociadas a un tumor son reconocidas por el sistema inmunitario específico del huésped portador del tumor, se habla de antígenos asociados a un tumor. En el reconocimiento específico de los antígenos asociados a un tumor participan mecanismos celulares y humorales que representan dos unidades conectadas funcionalmente entre sí: los linfocitos T CD4+ y CD8+ reconocen antígenos procesados que se presentan en las moléculas del MHC (Major Histocompatibility complex = antígenos de histocompatibilidad) de las clases II y I, respectivamente, mientras que los linfocitos B producen moléculas de anticuerpos circulantes que se unen directamente a antígenos sin procesar. La relevancia clínico-terapéutica potencial de los antígenos asociados a un tumor resulta del hecho de que el reconocimiento de los antígenos en las células neoplásicas por parte del sistema inmunitario da lugar a la iniciación de mecanismos efectores citotóxicos y, en presencia de células T colaboradoras, puede provocar la eliminación de las células cancerosas (Pardoll, Nat. Med. 4:525-31, 1998). Por consiguiente, un objetivo principal de la inmunología tumoral es el de definir molecularmente estas estructuras. La naturaleza molecular de estos antígenos fue un enigma durante mucho tiempo. Hasta que se desarrollaron las técnicas de clonación correspondientes, no se consiguió rastrear sistemáticamente los bancos de expresión de ADNc en tumores en antígenos asociados a un tumor mediante el análisis de las estructuras diana de los linfocitos T citotóxicos (CTL) (van der Bruggen et al., Science 254:1643-7, 1991) o con autoanticuerpos circulantes (Sahin et al., Curr. Opin. Immunol. 9:709-16, 1997) como sondas. Para ello, se prepararon bancos de expresión de ADNc a partir de tejido tumoral fresco y se expresaron como proteínas de forma recombinante en sistemas adecuados. Para clonar los respectivos antígenos, se usaron efectores inmunitarios aislados de pacientes, en concreto, clones de CTL con un patrón de lisis específico del tumor o autoanticuerpos circulantes.

Mediante estos enfoques se ha definido una pluralidad de antígenos en distintas neoplasias en los últimos años. No obstante, los métodos clásicos para identificar antígenos mostrados más arriba utilizan como sondas efectores inmunitarios (autoanticuerpos circulantes o clones de CTL) de pacientes con un cáncer por lo general ya avanzado. De una serie de datos se deduce que los tumores pueden dar lugar a, p. ej., la inducción de tolerancia y la anergización de las células T, y que, precisamente en el transcurso de la enfermedad, se pierden los aspectos específicos del repertorio de efectores inmunitarios que podrían provocar un reconocimiento inmunológico efectivo. De los estudios actuales en pacientes no se ha encontrado ninguna prueba definitiva de un efecto real de los antígenos asociados a un tumor descubiertos y usados hasta la fecha. Por consiguiente, no se puede descartar que las proteínas evocadas por las respuestas inmunitarias espontáneas sean las estructuras diana equivocadas.

La tarea de la presente invención era proporcionar estructuras diana para un diagnóstico y una terapia de las enfermedades de cáncer.

Esta tarea se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones según la invención.

Según la invención, se persiguió una estrategia para identificar y proporcionar antígenos expresados asociados a tumores y los ácidos nucleicos que los codifican. Esta estrategia se basa en el hecho de que determinados genes que se expresan de forma específica en órganos, p. ej., solo en el tejido del colon, de los pulmones o de los riñones, también son reactivados por células tumorales en los órganos correspondientes y, además, en células tumorales de otros tejidos de forma ectópica e indebida. En primer lugar, se elabora una lista lo más completa posible de todos los genes específicos de órganos conocidos mediante prospección de datos y, después, esta se evalúa respecto a su activación aberrante en distintos tumores mediante análisis de expresión a través de una RT-PCR específica. La prospección de datos es un método conocido para identificar genes asociados a un tumor. Sin embargo, en las estrategias convencionales, los transcriptomas de bancos de tejidos normales se suelen restar electrónicamente de los bancos de tejidos tumorales suponiendo que los genes restantes son específicos de

tumores (Schmitt et al., Nucleic Acids Res. 27:4251-60, 1999; Vasmatzis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 95:300-4, 1998; Scheurle et al., Cancer Res. 60:4037-43, 2000).

No obstante, el concepto según la invención, que ha mostrado ser mucho más satisfactorio, se basa en hacer uso de la prospección de datos para extraer electrónicamente todos los genes específicos de un órgano y, después, evaluarlos respecto a su expresión en tumores. Así, en un aspecto, la presente enseñanza se refiere a una estrategia para identificar genes específicos de tejidos con expresión diferencial en tumores. Esta estrategia combina la prospección de datos de bancos de secuencias públicos («in silico») con posteriores análisis experimentales de evaluación en laboratorio («wet bench»).

Una estrategia combinada que se basa en dos scripts bioinformáticos distintos permitió identificar nuevos genes tumorales según la invención. Hasta el momento, estos se habían clasificado simplemente como específicos de órganos. La conclusión de que estos genes se activan de forma aberrante en las células tumorales permite asignarles una calidad esencialmente nueva con implicaciones funcionales. La identificación y provisión de estos genes asociados a un tumor y de los productos génicos codificados por los mismos se efectuaron sin depender de un efecto inmunógeno.

Los antígenos asociados a un tumor identificados presentan una secuencia de aminoácidos que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO : 1-8, 41-44, 51-59, 84, 117, 119 y 138, una parte o un derivado de los mismos, (b) un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es redundante con respecto al ácido nucleico de (a) o de (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 un tumor identificado presenta una secuencia de aminoácidos que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 1-8, 41-44, 51-59, 84, 117, 119 y 138. En otra forma de realización preferida, un antígeno asociado a un tumor identificado comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 9-19, 45-48, 60-66, 85, 90-97, 100-102, 105, 106, 111-116, 118, 120, 123, 124, 135-137, 139 y 142-150, una parte o un derivado de los mismos.

La presente divulgación se refiere en general al uso de antígenos asociados a un tumor identificados según la divulgación, o de partes o derivados de los mismos, de ácidos nucleicos que los codifiquen o de ácidos nucleicos que estén dirigidos contra los ácidos nucleicos codificantes, o de anticuerpos que estén dirigidos contra los antígenos asociados a un tumor identificados o partes o derivados de los mismos para la terapia y el diagnóstico. Este uso puede referirse tanto a uno como a combinaciones de varios de estos antígenos, fragmentos funcionales, ácidos nucleicos, anticuerpos, etc., en una forma de realización, también en combinación con otros genes asociados a tumores para un diagnóstico, una terapia y un seguimiento.

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

La divulgación también se refiere a ácidos nucleicos y productos génicos con expresión asociada a las células tumorales.

Por otra parte, la presente enseñanza técnica se refiere a productos génicos, esto es, a ácidos nucleicos y proteínas o péptidos que se obtienen mediante el corte y empalme modificado (variantes de corte y empalme) de genes conocidos o mediante la traducción modificada utilizando marcos abiertos de lectura alternativos. En este aspecto, se divulgan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo formado por las secuencias según las SEQ ID NO: 3-5 de la lista de secuencias. Además, en este aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a proteínas o péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por las secuencias según las SEQ ID NO: 10 y 12-14 de la lista de secuencias. Las variantes de corte y empalme divulgadas se pueden usar como objetivos para el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades tumorales.

Particularmente, la presente enseñanza se refiere a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 10 de la lista de secuencias, que es codificada por un marco abierto de lectura alternativo identificado según la invención y se diferencia de la secuencia proteínica predeterminada (SEQ ID NO: 9) en 85 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de la proteína.

Los más diversos mecanismos pueden ser la causa de la aparición de variantes de corte y empalme, por ejemplo

- el uso de puntos variables de iniciación de la transcripción,
- el uso de exones adicionales,
- el corte y empalme completo o incompleto de uno o varios exones,
- las secuencias reguladoras de corte y empalme modificadas por mutación (deleción o generación de nuevas secuencias donadoras/aceptadoras),
- la eliminación incompleta de secuencias de intrones.

El corte y empalme modificado de un gen da lugar a una secuencia de transcripción modificada (variante de corte y empalme). Si una variante de corte y empalme se traduce en la zona de su secuencia modificada, se obtiene como resultado una proteína modificada que se puede diferenciar claramente de la originaria en su estructura y función. En el caso de las variantes de corte y empalme asociadas a tumores, pueden surgir transcripciones asociadas a tumores y proteínas/antígenos asociados a tumores. Estos se pueden usar como marcadores moleculares, tanto para detectar células tumorales como para el tratamiento dirigido de tumores. Según la invención, la detección de las células tumorales, p. ej., en la sangre, el suero, la médula ósea, el esputo, el lavado bronquial, las secreciones corporales y las biopsias de tejidos se puede efectuar, p. ej., mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de variantes de corte y empalme después de la extracción. Particularmente se adecúan como oligonucleótidos pares de cebadores, de los que al menos uno se une en condiciones restrictivas a la región de la variante de corte y empalme que se asocia al tumor. Según la divulgación, son adecuados los oligonucleótidos descritos en los ejemplos para este fin, particularmente, los oligonucleótidos que presentan o comprenden una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 34-36, 39, 40 y 107-110 de la lista de secuencias. Para la detección son adecuados todos los sistemas de detección dependientes de secuencias. Además de la PCR, estos son, p. ej., los sistemas de genochip/micromatriz, el método Northern blot, los ensayos de protección de RNAsa (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 las variantes de corte y empalme. Sin embargo, la detección de las células tumorales también se puede efectuar mediante anticuerpos que reconocen un epítopo específico codificado por la variante de corte y empalme. Para la preparación de los anticuerpos se pueden usar péptidos que sean muy específicos de esta variante de corte y empalme para la inmunización. En este aspecto, la enseñanza divulgada se refiere particularmente a péptidos que presentan o comprenden una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 17-19, 111-115, 120 y 137 de la lista de secuencias y anticuerpos específicos dirigidos contra los mismos. La detección de las células tumorales también se puede efectuar mediante anticuerpos que reconozcan las variantes de glucosilación modificadas de forma específica del tumor. Para generar anticuerpos de este tipo se pueden usar regiones de péptidos que se diferencien en células tumorales y células sanas a causa de la glucosilación. En este aspecto, la divulgación se refiere particularmente a péptidos que presentan o comprenden una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 17-19, 111-115, 120, 137 y 142-145 de la lista de secuencias, y a anticuerpos específicos dirigidos contra los mismos. La asparagina se transforma en ácido aspártico mediante la desglucosilación endógena de residuos de azúcar N-ligados. Por ello, según la invención, se puede modificar las secuencias de las proteínas descritas en la presente memoria de forma específica al tumor y, con ello, presentar otras propiedades bioquímicas y de unión a un anticuerpo. En este aspecto, la enseñanza divulgada se refiere particularmente a péptidos que presentan o comprenden una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 146-150 de la lista de secuencias y anticuerpos específicos dirigidos contra los mismos. Para la inmunización son especialmente adecuados los aminoácidos que presentan claras diferencias de epítopos con la o las variantes del producto génico que se forma o se forman preferiblemente en las células sanas. Así, la detección de las células tumorales con anticuerpos se puede efectuar en una muestra aislada del paciente o en forma de adquisición de imágenes con anticuerpos aplicados de forma intravenosa. Además de la utilidad diagnóstica, las variantes de corte y empalme que presentan epítopos nuevos o modificados representan objetivos atractivos para la terapia inmunitaria. Los epítopos se pueden usar para la manipulación dirigida de los anticuerpos monoclonales o linfocitos T eficaces desde un punto de vista terapéutico. En este sentido, en la inmunoterapia pasiva se transfieren de forma adoptiva anticuerpos o linfocitos T que reconocen epítopos específicos de variantes de corte y empalme. La generación de anticuerpos, como en otros antígenos, también se puede efectuar utilizando tecnologías estándares (inmunización de animales, estrategias de enriquecimiento para el aislamiento de anticuerpos recombinantes) utilizando polipéptidos que contengan estos epítopos. De forma alternativa, para la inmunización se pueden usar ácidos nucleicos que codifiquen oligo- o polipéptidos que contengan estos epítopos. Se conocen y se han descrito ampliamente distintas técnicas (cp., p. ej., Kessler JH, et al. 2001, Sahin et al., 1997) para la generación in vitro o in vivo de linfocitos T específicos de epítopos, y se basan igualmente en el uso de oligo- o polipéptidos que contienen los epítopos específicos de las variantes de corte y empalme o de ácidos nucleicos que los codifican. Los oligo- o polipéptidos que contienen estos epítopos específicos de las variantes de corte y empalme o los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos también se pueden usar en la inmunoterapia activa (vacunación, vacunoterapia) como sustancias eficaces desde un punto de vista farmacéutico.

En el presente documento, también se describen proteínas que se diferencian en su clase y cantidad de sus modificaciones secundarias en el tejido normal y el tumoral (p. ej., Durand & Seta, 2000; Clin. Chem. 46: 795-805; Hakomori, 1996; Cancer Res. 56: 5309-18).

El análisis de las modificaciones de las proteínas se puede efectuar en el método Western blot. Especialmente, las glucosilaciones que tienen por lo general un tamaño de varios kDa dan lugar a una masa total mayor de la proteína diana, que se puede separar en la SDS-PAGE. Para la detección de uniones O- o N-glucosídicas específicas, antes de la desnaturalización se incuban lisados proteínicos mediante SDS con O- o N-glucosilasas (según las indicaciones del fabricante en cuestión, p. ej., PNgasa, endoglucosidasa F, endoglucosidasa H, Roche Diagnostics). Seguidamente, tiene lugar un método Western blot. En caso de una reducción del tamaño de una proteína diana, se puede detectar de esta forma una glucosilación específica después de la incubación con una glucosidasa y, de este modo, analizar también la especificidad tumoral de una modificación. Las zonas de las proteínas que están glucosiladas de forma distinta en las células tumorales y en las células sanas son de un interés especial. Sin embargo, las diferencias de glucosilación de este tipo solo se han descrito para pocas proteínas de la superficie de las células (p. ej., Muc1) hasta el momento.

Según la invención, ha sido posible detectar una glucosilación diferencial en tumores para la claudina 18. Los carcinomas gastrointestinales, los carcinomas de páncreas, los tumores de esófago, los tumores de próstata, así como los tumores de pulmón presentan una forma menos glucosilada de la claudina 18. La glucosilación en tejidos sanos enmascara epítopos de proteínas de la claudina 18, que en las células tumorales están expuestos debido a una falta de glucosilación. Por consiguiente, según la invención se pueden seleccionar ligandos y anticuerpos que se unan a estos dominios. Según la invención, los ligandos y los anticuerpos de este tipo no se unen a la claudina 18 en células sanas, puesto que, en ellas, los epítopos están cubiertos por la glucosilación.

De forma similar a como se ha descrito más arriba en relación con los epítopos proteínicos derivados de variantes de corte y empalme asociadas a un tumor, la glucosilación diferencial se puede usar de esta forma para diferenciar entre células normales y tumorales con una 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 un tumor identificado según la divulgación y, preferentemente, es selectivo para las células que presentan una expresión o una expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. En determinadas formas de realización, el agente puede provocar la inducción de la muerte celular, la reducción del crecimiento celular, el daño de la membrana celular o la secreción de citocinas, y, preferentemente, presenta una actividad inhibidora del tumor. En una forma de realización, el agente es un ácido nucleico no codificante que hibrida de forma selectiva con el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el agente es un anticuerpo que se une de forma selectiva al antígeno asociado al tumor, particularmente, un anticuerpo activado por el complemento o conjugado a una toxina que se une de forma selectiva al antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el agente comprende varios agentes que reconocen respectivamente distintos antígenos asociados a un tumor de forma selectiva, de forma que, al menos uno de los antígenos asociados a un tumor, es un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. El reconocimiento no tiene que ir directamente acompañado de una inhibición de la actividad o de la expresión del antígeno. En este aspecto de la enseñanza técnica divulgada, el antígeno limitado de forma selectiva a los tumores sirve preferentemente como marcación para reunir mecanismos efectores en este lugar específico. En una forma de realización preferida, el agente es un linfocito T citotóxico que reconoce el antígeno en una molécula HLA y lisa las células marcadas de esta forma. En otra forma de realización, el agente es un anticuerpo que se une de forma selectiva al antígeno asociado al tumor y, con ello, reúne mecanismos efectores naturales o artificiales en esta célula. En otra forma de realización, el agente es un linfocito T colaborador que potencia las funciones efectoras de otras células que reconocen este antígeno de forma específica.

En un aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la expresión o la actividad de un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención. En una forma de realización preferida, el agente es un ácido nucleico no codificante que hibrida de forma selectiva con el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el agente es un anticuerpo que se une de forma selectiva al antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el agente comprende varios agentes que inhiben respectivamente la expresión o la actividad de distintos antígenos asociados a un tumor de forma selectiva, de forma que, al menos uno de los antígenos asociados al tumor es un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación.

Por otra parte, la enseñanza divulgada se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente que, en una administración, aumenta de forma selectiva la cantidad de complejos entre una molécula HLA y un epítopo de un péptido del antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. En una forma de realización, el agente comprende uno o varios componentes que se seleccionan del grupo formado por (i) el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, (ii) un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, (iii) una célula huésped que expresa el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, y (iv) complejos aislados entre epítopos de péptidos del antígeno asociado al tumor y una molécula MHC. En una forma de realización, el agente comprende varios agentes que aumentan respectivamente la cantidad de complejos entre las moléculas del MHC y los epítopos de los péptidos de distintos antígenos asociados a tumores de forma selectiva, de manera que al menos uno de los antígenos asociados a un tumor es un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación.

Por otra parte, la enseñanza divulgada se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o varios componentes que se seleccionan del grupo formado por (i) un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o una parte del mismo, (ii) un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o una parte del mismo, (iii) un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o a una parte del mismo, (iv) un ácido nucleico no codificante que hibrida de forma específica con un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación, (v) una célula huésped que expresa un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o una parte del mismo, y (vi) complejos aislados entre un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o una parte del mismo, y una molécula HLA.

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

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

Un anticuerpo contenido en una composición farmacéutica puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, un fragmento de un anticuerpo natural o un anticuerpo sintético, de los cuales todos se pueden preparar mediante técnicas combinatorias. El anticuerpo puede estar ligado a un agente o a una sustancia útil desde un punto de vista terapéutico o diagnóstico.

Un ácido nucleico no codificante contenido en una composición farmacéutica puede comprender una secuencia de 6-50, particularmente, de 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor identificado según la divulgación.

En otras formas de realización, un antígeno asociado a un tumor proporcionado, bien directamente, o bien mediante la expresión de un ácido nucleico por la composición farmacéutica según la invención o una parte del mismo, se une a moléculas del MHC en la superficie de las células, de forma que la unión provoca preferentemente una reacción citolítica y/o induce una liberación de citocina.

Una composición farmacéutica puede comprender un vehículo y/o un adyuvante farmacéuticamente compatible. El adyuvante se puede seleccionar de entre saponina, GM-CSF, nucleótidos CpG, ARN, una citocina o una quimiocina. Preferentemente, se emplea una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad que se distingue por la expresión selectiva o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor. En una forma de realización preferida, la enfermedad es el cáncer.

Por otra parte, la enseñanza divulgada se refiere a métodos para el tratamiento, el diagnóstico y/o la observación de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de uno o varios antígenos asociados a un tumor. En una forma de realización, el tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica.

Preferentemente, la enfermedad es el cáncer, de forma que el término «cáncer» comprende de forma no limitativa leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, gliomas, cáncer de riñón, cáncer de glándulas suprarrenales, cáncer de tiroides, cáncer de intestino, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer de los ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovarios y cáncer de pulmón, así como sus metástasis.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. El método comprende la detección de (i) un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y/o (ii) la detección del antígeno asociado al tumor o de una parte del mismo, y/o (iii) la detección de un anticuerpo contra el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y/o (iv) la detección de linfocitos T citotóxicos o colaboradores que son específicos del antígeno asociado al tumor o de una parte del mismo en una muestra biológica aislada de un paciente. En determinadas realizaciones, la detección comprende (i) el contacto de la muestra biológica con un agente que se une de forma específica al ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, al antígeno asociado al tumor o a la parte del mismo, al anticuerpo o a linfocitos T citotóxicos o colaboradores que son específicos del antígeno asociado al tumor o de las partes del mismo, y (ii) la detección de la formación de un complejo entre el medio y el ácido nucleico o la parte del mismo, el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo, el anticuerpo o los linfocitos T citotóxicos o colaboradores. En una forma de realización, la enfermedad se distingue por la expresión o la expresión anómala de varios antígenos distintos asociados a un tumor, y la detección comprende la detección de varios ácidos nucleicos que codifican los varios antígenos distintos asociados a un tumor o las partes de los mismos, la detección de los varios antígenos distintos asociados al tumor o de las partes de los mismos, la detección de varios anticuerpos que se unen a los varios antígenos distintos asociados al tumor o a las partes de los mismos, o la detección de varios linfocitos T citotóxicos o colaboradores que son específicos de los varios antígenos distintos asociados al tumor. En otra forma de realización, la muestra biológica aislada del paciente se compara con una muestra biológica normal comparable.

En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para determinar la regresión, el desarrollo o la aparición de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención, que comprende la observación de una muestra de un paciente que presenta la enfermedad o del que se sospecha que puede contraer la enfermedad respecto a uno o varios parámetros que se seleccionan del grupo formado por (i) la cantidad de ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, (ii) la cantidad del antígeno asociado al tumor o de una parte del mismo, (iii) la cantidad de anticuerpos que se unen al antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, y (iv) la cantidad de células T citolíticas o células T colaboradoras que son específicas de un complejo entre el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y una molécula del MHC. Preferentemente, el método comprende la determinación del o de los parámetros en una primera muestra en un primer momento y en otra muestra en un segundo momento, de forma que el desarrollo de la enfermedad se obtiene de la comparación de ambas muestras. En determinadas formas de realización, la enfermedad se distingue por la expresión o la expresión anómala de varios antígenos distintos asociados a un tumor, y la observación comprende una observación (i) de la cantidad de los varios ácidos nucleicos que codifican los varios antígenos distintos asociados al tumor o las partes de los mismos y/o (ii) de la cantidad de los varios antígenos distintos asociados al tumor o de las partes de los mismos y/o (iii) de la cantidad de los varios anticuerpos que se unen a los varios antígenos distintos asociados al tumor o a partes de los mismos, y/o (iv) de la cantidad de las varias células T citolíticas o células T colaboradoras que son específicas de los complejos entre los varios antígenos distintos asociados al tumor o las partes de los mismos y las moléculas del MHC.

Según la invención se puede efectuar una detección de un ácido nucleico o de una parte del mismo, o una observación de la cantidad de un ácido nucleico o de una parte del mismo, con una sonda de polinucleótidos que hibrida específicamente con el ácido nucleico o con la parte del mismo, o se puede efectuar amplificando selectivamente el ácido nucleico o la parte del mismo. En una forma de realización, la sonda de polinucleótidos comprende una secuencia de 6-50, particularmente, de 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico.

En determinadas formas de realización, el antígeno asociado al tumor que detectar o la parte del mismo se encuentra de forma intracelular o en la superficie de la célula. Según la invención se puede efectuar una detección de un antígeno asociado a un tumor o una parte del mismo, o una observación de la cantidad de un antígeno asociado a un tumor o de una parte del mismo, con un anticuerpo que se una de forma específica al antígeno asociado al tumor o a la parte del mismo.

En otras formas de realización, el antígeno asociado al tumor que detectar o la parte del mismo se encuentra en un complejo con una molécula del MHC, particularmente, con una molécula HLA.

Según la invención se puede efectuar una detección de un anticuerpo o la observación de la cantidad de anticuerpos con una proteína o un péptido que se una de forma específica al anticuerpo.

Según la invención se puede efectuar una detección de células T citolíticas o células T colaboradoras, o la observación de la cantidad de células T citolíticas o células T colaboradoras que son específicas de complejos entre un antígeno o una parte del mismo y las moléculas del MHC con una célula que presente el complejo entre el antígeno o la parte del mismo y una molécula del MHC.

Preferentemente, la sonda de polinucleótidos usada para una detección o para una observación, el anticuerpo, la proteína o el péptido, o la célula están marcados de forma que se pueden detectar. En determinadas formas de realización, el marcador que se puede detectar es un marcador radioactivo o un marcador enzimático. De forma adicional, la detección de los linfocitos T se puede efectuar hallando su proliferación, su producción de citocina, así como su actividad citotóxica, que es provocada por la estimulación específica con el complejo de la MHC y el antígeno asociado al tumor o las partes del mismo. Asimismo, la detección de los linfocitos T puede efectuarse por una molécula del MHC recombinante, o bien por un complejo de varias moléculas del MHC cargadas con el fragmento inmunógeno respectivo de uno o de varios de los antígenos asociados al tumor, y por el contacto del receptor específico de la célula T, con lo que se pueden identificar linfocitos T específicos.

En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para el tratamiento, el diagnóstico y la observación de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención, que comprende la administración de un anticuerpo que se une al antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, y está ligado al agente o a la sustancia terapéuticos o diagnósticos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo natural.

En algunas formas de realización, los métodos divulgados se efectúan para el diagnóstico o la observación de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación usando o mediante la detección de células tumorales diseminantes o de metástasis tumorales. Una detección de células tumorales diseminantes se puede efectuar, por ejemplo, en la sangre, el suero, la médula ósea, el esputo, el aspirado bronquial y/o el lavado bronquial.

Igualmente, la enseñanza divulgada se refiere a un método para el tratamiento de un paciente con una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación, que comprende (i) la extracción de una muestra de células inmunorreactivas del paciente, (ii) el contacto de la muestra con una célula huésped que expresa el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo en condiciones que favorecen una producción de células T citolíticas contra el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, y (iii) la introducción de las células T citolíticas en el paciente, en una cantidad que es adecuada para lisar células que expresan el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo. Igualmente, la presente enseñanza se refiere a la clonación del receptor de célula T de las células T citolíticas contra el antígeno asociado al tumor. Este se puede transferir a otras células T, que consiguen así la especificidad deseada y se pueden introducir en el paciente como se describe en (iii).

En una forma de realización, la célula huésped expresa una molécula HLA de forma endógena. En otra forma de realización, la célula huésped expresa una molécula HLA y/o el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo de forma recombinante. Preferentemente, la célula huésped no es proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula que presenta un antígeno, particularmente, una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor, que comprende (i) la identificación de un ácido nucleico expresado por células asociadas con la enfermedad, el cual codifica el antígeno asociado al tumor identificado según la invención, (ii) la transfección de una célula huésped con el ácido nucleico o una parte del mismo, (iii) el cultivo de la célula huésped transferida para una expresión del ácido nucleico (esto no es obligatorio si se alcanza una tasa de transfección elevada) y (iv) la introducción de las células huésped o de una extracción de las mismas en el paciente, en una cantidad que sea adecuada para aumentar la reacción inmunitaria contra las células del paciente que se asocian con la enfermedad. Asimismo, el método puede comprender la identificación de una molécula del MHC que presente el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, de

forma que la célula huésped exprese la molécula del MHC identificada y presente el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo. La reacción inmunitaria puede comprender una reacción de células B o una reacción de células T. Por otra parte, una reacción de las células T puede comprender la producción de células T citolíticas y/o células T colaboradoras específicas de las células huésped que presenten el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo o que sean específicas de las células del paciente que expresan el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo.

La enseñanza divulgada también se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención, que comprende (i) la identificación de las células del paciente que expresan cantidades anómalas del antígeno asociado al tumor, (ii) el aislamiento de una muestra de las células, (iii) el cultivo de las células y (iv) la introducción de las células en el paciente, en una cantidad adecuada para activar una reacción inmunitaria contra las células.

Preferentemente, las células huésped usadas según la divulgación no son proliferativas o se constituyen de forma no proliferativa. Una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor es en particular el cáncer.

Por otra parte, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por las SEQ ID NO: 3-5, una parte o un derivado del mismo, (b) un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es redundante respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c). Por otra parte, la divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por las SEQ ID NO: 10, 12-14 y 146-150, una parte o un derivado de los mismos.

En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a secuencias promotoras de los ácidos nucleicos según la divulgación. Estas se pueden enlazar funcionalmente con otro gen, preferentemente, en un vector de expresión y, con ello, garantizar la expresión selectiva de este gen en las células correspondientes.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante, en particular, a una molécula de ADN o ARN que comprende un ácido nucleico según la divulgación.

La presente enseñanza también se refiere 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.

Asimismo, la célula huésped puede comprender un ácido nucleico que codifique una molécula HLA. En una forma de realización, la célula huésped expresa la molécula HLA de forma endógena. En otra forma de realización, la célula huésped expresa la molécula HLA y/o el ácido nucleico según la divulgación, o una parte del mismo, de forma recombinante. Preferentemente, la célula huésped no es proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula que presenta un antígeno, particularmente, una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

En otra forma de realización, la enseñanza divulgada se refiere a oligonucleótidos que hibridan con un ácido nucleico identificado según la divulgación y que se pueden usar como sondas genéticas o como moléculas no codificantes. Las moléculas de ácido nucleico en forma de cebadores de oligonucleótidos o las muestras competentes que hibriden con un ácido nucleico identificado según la divulgación o con partes del mismo se pueden usar para encontrar ácidos nucleicos que sean homólogos al ácido nucleico identificado según la divulgación. Para encontrar ácidos nucleicos homólogos se puede usar la amplificación por PCR, así como la hibridación tipo Northern o Southern. La hibridación se puede efectuar en condiciones poco, o mejor, moderadamente, o aún mejor, muy restrictivas. El término «condiciones restrictivas» se refiere, según la invención, a condiciones que permiten una hibridación específica entre los polinucleótidos.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una proteína, un polipéptido o un péptido que son codificados por un ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por la SEQ ID NO : 3-5, una parte o un derivado del mismo, (b) un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es redundante 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, la divulgación se refiere a una proteína o a un polipéptido o péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por las SEQ ID NO: 10, 12-14 y 146-150, una parte o un derivado de los mismos.

En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un fragmento inmunógeno de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. Preferentemente, el fragmento se une a un receptor de HLA humano o a un anticuerpo humano. Preferentemente, un fragmento según la divulgación comprende una secuencia de al menos 6, particularmente, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 aminoácidos.

En este aspecto, la divulgación se refiere particularmente a un péptido que presenta o comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por las SEQ ID NO: 17-19, 90-97, 100-102, 105, 106, 111-116, 120, 123, 124, 135-137, 139 y 142-150, una parte o un derivado de los mismos.

En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un agente que se une a un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o a una parte del mismo. En una forma de realización preferida, el agente es un anticuerpo. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o preparado con técnicas combinatorias, o un fragmento de un anticuerpo. Por otra parte, la divulgación se refiere a un anticuerpo que se une de forma selectiva a un complejo de (i) un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o una parte del mismo y (ii) una molécula del MHC, a la que se une al antígeno asociado al tumor identificado según la divulgación o la parte de mismo, de forma que el anticuerpo no se une solo a (i) o (ii). Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo natural.

Particularmente, la presente divulgación se refiere a un agente de este tipo, particularmente, a un anticuerpo que se une de forma específica a un péptido que presenta o comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por las SEQ ID NO.: 17-19, 90-97, 100-102, 105, 106, 111-116, 120, 123, 124, 135-137, 139 y 142-150, una parte o un derivado de los mismos.

En cuanto a la claudina 18, la invención también se refiere a agentes, particularmente anticuerpos que se unen de forma específica a una variante de la claudina 18. En una forma de realización, el agente, particularmente un anticuerpo se une de forma específica a la variante claudina 18A1 (SEQ ID NO: 118). En otra forma de realización, el agente, particularmente un anticuerpo se une, de forma específica, a la variante claudina 18A2 (SEQ ID NO: 16). Los anticuerpos específicos de este tipo se pueden obtener, por ejemplo, mediante una inmunización con los péptidos descritos en el Ejemplo 4.

Por otra parte, en cuanto a la claudina 18, la invención se refiere a agentes, particularmente, anticuerpos, que se unen de forma específica a un tipo de claudina 18A2 que presenta un patrón de glucosilación determinado. En una forma de realización, el agente, particularmente, un anticuerpo, se une de forma específica a un tipo de claudina 18A2 que no está glucosilado en uno o varios puntos posibles de glucosilación. En otra forma de realización, el agente, particularmente, un anticuerpo, se une de forma específica a un tipo de claudina 18A2 que está glucosilado en uno o varios puntos posibles de glucosilación. Preferentemente, un punto de glucosilación posible de este tipo se refiere a una o varias posiciones seleccionadas del grupo formado por las posiciones de aminoácidos 37, 38, 45, 116, 141, 146 y 205 de la claudina 18A2. Por otra parte, una glucosilación posible de este tipo se refiere a, preferentemente, una N-glucosilación.

En este contexto, un agente específico de una variante o un tipo de claudina 18, particularmente, un anticuerpo específico de una variante o un tipo de claudina 18, quiere decir que el agente o el anticuerpo se unen en mayor medida a la variante o al tipo del que es específico que a otra variante o tipo. Un agente, particularmente, un anticuerpo, se une en mayor medida a una primera variante o a un primer tipo, o a un primer epítopo en comparación con una segunda variante o un segundo tipo, o un segundo epítopo, si se une a la primera variante o al segundo tipo, o al primer epítopo, con una constante de disociación (KD) que es más reducida que la constante de disociación de la segunda variante o del segundo tipo, o del segundo epítopo. Preferentemente, la constante de disociación (KD) de la variante o del tipo, o del epítopo, a la/al que se une de forma específica el agente, particularmente, el anticuerpo, es 10 veces, preferentemente, 20 veces, más preferiblemente, 50 veces, aún más preferiblemente, 100 veces y, particularmente, 200 veces, 500 veces o 1000 veces más reducida que la constante de disociación (KD) de la variante o la forma, o del epítopo, a la/al que se une el agente, particularmente, el anticuerpo de forma no específica. Preferentemente, un agente, particularmente, un anticuerpo, no se une o no se une principalmente a la variante o al tipo, o al epítopo del que el agente, particularmente, el anticuerpo no es específico.

Los agentes descritos anteriormente, particularmente, los anticuerpos y los derivados de los mismos como se describen en la presente memoria que se unen de forma específica a una variante o a un tipo de claudina 18 también están previstos para su uso en las composiciones y los métodos según la invención.

Por otro lado, la invención se refiere a un conjugado entre un agente según la invención, que se une a un antígeno asociado al tumor identificado según la divulgación o a una parte del mismo, o un anticuerpo según la divulgación, y un agente o una sustancia terapéuticos o diagnósticos. En una forma de realización, el agente terapéutico o diagnóstico es una toxina.

En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un kit para detectar la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención que comprende medios para detectar (i) el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, (ii) el antígeno asociado al tumor o una parte de mismo, (iii) los anticuerpos que se unen al antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, y/o (iv) las células T que son específicas de un complejo entre el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y una molécula del MHC. 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 una secuencia de 6-50, particularmente, 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describen genes que se expresan de forma selectiva o de forma aberrante en las células tumorales y que representan antígenos asociados al tumor.

Según la divulgación, estos genes y/o sus productos génicos y/o sus derivados y/o sus partes son estructuras diana preferidas para técnicas terapéuticas. Desde el punto de vista conceptual, las fórmulas terapéuticas pueden estar orientadas a una inhibición de la actividad del producto génico asociado al tumor expresado de forma selectiva. Ello es útil si la respectiva expresión aberrante selectiva es importante a nivel funcional en cuanto a la patogénesis del tumor y su supresión va acompañada de un daño selectivo de las células correspondientes. Otros conceptos terapéuticos consideran los antígenos asociados a tumores como marcaciones que reúnen de forma selectiva mecanismos efectores con potencial dañino para las células en las células tumorales. En este sentido, la función de la propia molécula diana y su papel en la formación del tumor son totalmente insignificantes.

Según la divulgación, se entiende por «derivado» de un ácido nucleico que, en el ácido nucleico, se encuentran una o múltiples sustituciones, deleciones y/o adiciones de nucleótidos. Además, el término «derivado» también comprende una obtención química de derivados de un ácido nucleico en una base nucleótida, en el azúcar o en el fosfato. El término «derivado» también comprende ácidos nucleicos que incluyen nucleótidos y análogos de nucleótidos que no están presentes en la naturaleza.

Según la divulgación, un ácido nucleico es preferentemente el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos comprenden, según la invención, los ADN, ADNc y ARNm genómicos, así como las moléculas preparadas de forma recombinante y sintetizadas químicamente. Según la divulgación, un ácido nucleico puede encontrarse en forma de molécula monocatenaria o bicatenaria, y lineal o cerrada de forma circular covalente.

Preferentemente, los ácidos nucleicos descritos según la divulgación están aislados. Según la invención, el término «ácido nucleico aislado» significa que el ácido nucleico (i) se ha amplificado in vitro, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) se ha producido de forma recombinante mediante clonación, (iii) se ha purificado, por ejemplo, mediante escisión y separación por electroforesis en gel, o (iv) se ha sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado en un ácido nucleico que está disponible para una manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

Un ácido nucleico es «complementario» a otro ácido nucleico si las dos secuencias hibridan entre sí y pueden constituir una secuencia doble estable, de forma que la hibridación se efectúa preferentemente en condiciones que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones restrictivas). Las condiciones restrictivas se han descrito, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., eds. 2.ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65 ºC en tampones de hibridación (3,5 x SSC, 0,02 % de Ficoll, 0,02 % de polivinilpirrolidona, 0,02 % de seroalbúmina bovina, 2,5 mM de NaH2PO4 (pH7), 0,5 % de SDS, 2 mM de EDTA). El SSC es 0,15 M de cloruro de sodio/ 0,15 M de citrato de sodio, pH 7. Después de la hibridación, la membrana a la que se ha transferido el ADN se lava en, por ejemplo, 2 x SSC a temperatura ambiente y, después, en 0,1 - 0,5 x SSC/ 0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68 ºC.

Según la invención, los ácidos nucleicos complementarios presentan, al menos, un 40 %, particularmente, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % y, preferentemente, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de los nucleótidos.

Según la divulgación, los ácidos nucleicos que codifican los antígenos asociados a tumores pueden encontrarse solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, particularmente, con ácidos nucleicos heterólogos. En algunas formas de realización preferidas, un ácido nucleico se encuentra enlazado funcionalmente con secuencias controladoras de la expresión o secuencias reguladoras que pueden ser homólogas o heterólogas respecto al ácido nucleico. Una secuencia codificante y una secuencia reguladora están enlazadas entre sí «de manera funcional» si están vinculadas entre sí de forma covalente de tal manera que la expresión o la transcripción de la secuencia codificante está bajo el control o bajo la influencia de la secuencia reguladora. En el caso de que la secuencia codificante se tenga que traducir a una proteína funcional, en un enlace funcional de una secuencia reguladora con la secuencia codificante, una inducción de la secuencia reguladora da lugar a una transcripción de la secuencia codificante, sin que se provoque un desplazamiento del marco de lectura en la secuencia codificante o una incapacidad de la secuencia codificante de ser traducida a la proteína o al péptido deseados.

Según la invención, el término «secuencia controladora de la expresión» o «secuencia reguladora» comprende promotores, potenciadores y otros elementos controladores que dirigen la expresión de un gen. En determinadas formas de realización, las secuencias controladoras de la expresión son regulables. La estructura exacta de las secuencias reguladoras puede variar en función de la especie o del tipo de célula, pero comprende en general secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas que participan en la iniciación de la transcripción o de la traducción, como la caja TATA, la secuencia de caperuza, la secuencia CAAT y similares. Particularmente, las secuencias reguladoras 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para un control transcripcional del gen enlazado de forma funcional. Las secuencias reguladoras también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras situadas antes del extremo 5' del promotor.

Así, los antígenos asociados al tumor mostrados en este caso pueden, por un lado, combinarse con secuencias controladoras de la expresión y promotores de forma arbitraria. No obstante, por otro lado, los promotores de los productos génicos asociados al tumor mostrados en este caso pueden combinarse con otros genes de forma arbitraria. Ello permite aprovechar la actividad selectiva de estos promotores.

Por otra parte, un ácido nucleico según la invención puede encontrarse enlazado a otro ácido nucleico que codifique un polipéptido que dirija una secreción desde una célula huésped de la proteína o del polipéptido codificados por el ácido nucleico. Un ácido nucleico también puede encontrarse enlazado a otro ácido nucleico que codifique un polipéptido que cause una fijación de la proteína o del polipéptido codificados en la membrana celular de la célula huésped o su compartimentalización en determinados orgánulos de esta célula. Del mismo modo, puede efectuarse una unión a un ácido nucleico que muestre un gen identificador o un marcador cualquiera.

En una forma de realización preferida, una molécula de ADN recombinante es un vector, en su caso, con un promotor, que dirige la expresión de un ácido nucleico, p. ej., de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado al tumor según la divulgación. Así, el término «vector» se usa en su sentido más general y comprende todo tipo de vehículos intermediarios de un ácido nucleico que hacen posible, p. ej., introducir el ácido nucleico en células procariotas y/o eucariotas y, en su caso, integrarlo en un genoma. Preferentemente, los vectores de este tipo se duplican y/o se expresan en la célula. Se puede adaptar un vehículo intermediario para, p. ej., su uso en la electroporación, el bombardeo con microproyectiles, la administración liposomal, en la transferencia utilizando bacterias *Agrobacterium*, o en la inserción mediante virus ADN o ARN. Los vectores comprenden plásmidos, fagómidos o genomas virales.

Los ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación se pueden emplear para una transfección de las células huésped. Así, se entiende por ácidos nucleicos tanto el ARN como el ADN recombinante. El ARN recombinante se puede preparar por transcripción in vitro de una plantilla de ADN. Por otra parte, se puede modificar mediante secuencias estabilizantes, caperuzas y poliadenilación antes de la aplicación.

Según la divulgación, el término «célula huésped» se refiere a cada una de las células que se puede transformar con o a la que se puede transferir un ácido nucleico exógeno. Según la invención, el término «células huésped» comprende células procariotas (p. ej., E. coli) o eucariotas (p. ej., células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células de levadura y células de insectos). Especialmente preferidas son las células de mamíferos, como las células del hombre, de ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células pueden proceder de una pluralidad de tipos de tejido y comprenden células primarias y líneas celulares. Los ejemplos

específicos comprenden queratinocitos, leucocitos periféricos de la sangre, células madre de la médula ósea y células madre embrionarias no humanas. En otras formas de realización, la célula huésped es una célula que presenta un antígeno, particularmente, una célula dendrítica, un monocito o un macrófago. Un ácido nucleico puede encontrarse en la célula huésped en una única o en varias copias, y se expresa en la célula huésped en una forma de realización.

El término «expresión» se usa, según la divulgación, en su sentido más general y comprende la producción de ARN o de ADN, y de proteínas. También comprende una expresión parcial de los ácidos nucleicos. Por otra parte, la expresión puede efectuarse de forma transitoria o estable. Los sistemas de expresión preferidos en las células de mamíferos comprenden pcDNA3.1 y pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), que incluyen un marcador seleccionable, como un gen, que proporciona una resistencia frente a G418 (y, con ello, hace posible una selección de líneas celulares transferidas de forma estable), y las secuencias promotoras potenciadoras del citomegalovirus (CMV).

En los casos de la divulgación en los que una molécula HLA presenta un antígeno asociado a un tumor o una parte del mismo, un vector de expresión también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifique la molécula HLA. La secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula HLA puede encontrarse en el mismo vector de expresión que el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo, o bien los dos ácidos nucleicos pueden encontrarse en distintos vectores de expresión. En el último caso, los dos vectores de expresión se pueden transferir de forma conjunta a una célula. En el caso de que una célula huésped no exprese el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo ni la molécula de HLA, los dos ácidos nucleicos que lo codifican se transfieren a la célula, bien en el mismo vector de expresión, o bien en distintos vectores de expresión. En el caso de que la célula ya exprese la molécula HLA, solo se puede transferir a la célula la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo.

Según la divulgación, se comprenden kits para la amplificación de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor. Los kits de este tipo comprenden, por ejemplo, un par de cebadores de amplificación que se hibridan en el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor. Preferentemente, los cebadores comprenden una secuencia de 6-50, particularmente, 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico y no se solapan para evitar la formación de dímeros cebadores. Uno de los cebadores hibridará en una cadena del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor, y el otro cebador hibridará en la cadena complementaria en una disposición que permite una amplificación del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor.

Las moléculas «no codificantes» o los ácidos nucleicos «no codificantes» se pueden usar para regular, particularmente, para reducir la expresión de un ácido nucleico. Según la invención, el término «molécula no codificante» o «nucleótido no codificante» se refiere a un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, un oligorribonucleótido modificado o un oligodesoxirribonucleótido modificado, y que hibrida en un ADN que comprende un gen determinado o en un ARNm de este gen en condiciones fisiológicas, con lo que se inhibe la transcripción de este gen y/o la traducción de este ARNm. Según la divulgación, una «molécula no codificante» también comprende una construcción que incluye un ácido nucleico o una parte del mismo en una orientación inversa respecto a su promotor natural. Una transcripción no codificante de un ácido nucleico o de una parte del mismo puede constituir una transcripción doble con el ARNm presente de forma natural que especifica la enzima y, así, impedir una acumulación de ARNm o una traducción del mismo a la enzima activa. Otra posibilidad es el uso de ribozimas para inactivar un ácido nucleico. Los oligonucleótidos no codificantes preferidos presentan una secuencia de 6-50, particularmente, de 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico diana y, preferentemente, son completamente complementarios al ácido nucleico diana o a una parte del mismo.

En algunas formas de realización preferidas, el oligonucleótido no codificante hibrida con un punto N-terminal o situado en dirección 5', como un punto de iniciación de la traducción, de iniciación de la transcripción o un punto promotor. En otras formas de realización, el oligonucleótido no codificante hibrida con una región 3' no traducida o un punto de corte y empalme de ARNm.

En una forma de realización, un oligonucleótido está formado por ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o una combinación de los mismos. En este caso, el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido están vinculados entre sí por un enlace fosfodiéster. Estos oligonucleótidos se pueden sintetizar de manera convencional o producir de forma recombinante.

En algunas formas de realización preferidas, un oligonucleótido es un oligonucleótido «modificado». En ese caso, para, por ejemplo, aumentar su estabilidad o su eficacia terapéutica, el oligonucleótido puede estar modificado de

las formas más diversas sin que se vea afectada su capacidad de unirse a su diana. El término «oligonucleótido modificado» significa, según la invención, un oligonucleótido en el que (i) al menos dos de sus nucleótidos están vinculados entre sí mediante un enlace internucleósido sintético (esto es, un enlace internucleósido, que no es ningún enlace fosfodiéster) y/o (ii) un grupo químico está enlazado de forma covalente con un oligonucleótido que normalmente no se da en los ácidos nucleicos. Los enlaces internucleósidos sintéticos preferidos son los fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, los ésteres de fosfato, los alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidas, ésteres de carboximetilo y los péptidos.

El término «oligonucleótido modificado» también comprende oligonucleótidos con una base modificada de forma covalente y/o azúcar. Por ejemplo, los «oligonucleótidos modificados» comprenden oligonucleótidos con restos de azúcar que se unen de forma covalente a grupos orgánicos con un peso molecular reducido que no son ningún grupo hidroxílico en la posición 3' ni ningún grupo de fosfato en la posición 5'. Los oligonucleótidos modificados pueden comprender, por ejemplo, un resto de ribosa 2'-O-alquilado u otro azúcar en lugar de la ribosa, como la arabinosa.

Preferentemente, las proteínas y los polipéptidos descritos según la divulgación están aislados. Los términos «proteína aislada» o «polipéptido aislado» significan que la proteína o el polipéptido están separados de su entorno natural. Una proteína aislada o un polipéptido aislado pueden encontrarse en un estado esencialmente purificado. El término «esencialmente purificado» significa que la proteína o el polipéptido se encuentran esencialmente exentos de otras sustancias con las que se encuentran en la naturaleza o in vivo. Las proteínas y los polipéptidos de este tipo sirven, por ejemplo, para preparar anticuerpos y se pueden emplear en un ensayo inmunológico o diagnóstico, o como agentes terapéuticos. Según la divulgación, las proteínas y los polipéptidos descritos se pueden aislar de muestras biológicas, como homogeneizados de células o de tejidos, y también se pueden expresar de manera recombinante en una pluralidad de sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

Los «derivados» de una proteína o de un polipéptido, o una secuencia de aminoácidos en el sentido de esta invención comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de deleción de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxiterminales, así como inserciones de uno o varios aminoácidos en una secuencia de aminoácidos determinada. En el caso de las variantes de secuencias de aminoácidos con una inserción, se introducen uno o varios restos de aminoácidos en un punto predeterminado de una secuencia de aminoácidos, si bien también es posible una inserción casual con un rastreo adecuado del producto resultante. Las variantes de deleción de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o varios aminoácidos de la secuencia. Las variantes de sustitución de aminoácidos se distinguen por que se elimina al menos un resto de la secuencia y se incorpora otro resto en su lugar. Preferentemente, las modificaciones se sitúan en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas homólogas o polipéptidos. Preferentemente, los aminoácidos se sustituyen por otros con propiedades parecidas, como hidrofobia, hidrofilia, electronegatividad, volumen de la cadena lateral y similares (sustitución conservadora). Las sustituciones conservadoras se refieren, por ejemplo, al intercambio de un aminoácido por otro. A continuación, se muestran los aminoácidos del mismo grupo que el aminoácido sustituido:

1. Restos pequeños alifáticos, no polares 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. Restos grandes alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val (Cys)

5. Restos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

Tres residuos se han puesto entre paréntesis debido a su importante papel en la arquitectura proteínica. El Gly es el único resto sin cadena lateral y, por ello, proporciona flexibilidad a la cadena. El Pro cuenta con una geometría inusual que limita en gran medida a la cadena. El Cys puede formar un puente disulfuro.

Las variantes de aminoácidos descritas más arriba se pueden preparar fácilmente utilizando técnicas de síntesis de péptidos conocidas, como p. ej., mediante «síntesis en fase sólida» (Merrifield, 1964) y métodos similares, o mediante una manipulación del ADN recombinante. Las técnicas para incorporar mutaciones de sustitución en puntos predeterminados del ADN que cuenta con una secuencia conocida o parcialmente conocida se conocen

ampliamente y comprenden, p. ej., la mutagénesis mediante M13. La manipulación de las secuencias de ADN para preparar proteínas con sustituciones, inserciones o deleciones se describe detalladamente en, p. ej., Sambrook et al. (1989).

Los «derivados» de proteínas, polipéptidos o péptidos también comprenden sustituciones, deleciones y/o adiciones individuales o múltiples de las moléculas que están asociadas con la enzima, como los hidratos de carbono, los lípidos y/o las proteínas, los polipéptidos o los péptidos. Asimismo, el término «derivado» también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de las proteínas, los polipéptidos o los péptidos.

Una parte o un fragmento de un antígeno asociado a un tumor presentan una propiedad funcional del polipéptido del que deriva. Las propiedades funcionales de este tipo comprenden la interacción con anticuerpos, la interacción con otros polipéptidos o proteínas, el enlace selectivo de los ácidos nucleicos y una actividad enzimática. Una propiedad importante es la capacidad de constituir un complejo con HLA y, en su caso, activar una reacción inmunitaria. Esta reacción inmunitaria puede basarse en la estimulación de las células T citotóxicas o colaboradoras. Preferentemente, una parte o un fragmento de un antígeno asociado a un tumor según la invención comprenden una secuencia de al menos 6, particularmente, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 aminoácidos contiguos del antígeno asociado al tumor.

Según la divulgación, una parte o un fragmento de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor se refiere a la parte del ácido nucleico que codifica al menos el antígeno asociado al tumor y/o una parte o un fragmento del antígeno asociado al tumor como se ha definido anteriormente.

El aislamiento y la identificación de los genes que codifican antígenos asociados al tumor también hacen posible el diagnóstico de una enfermedad que se distingue por la expresión de uno o varios antígenos asociados al tumor. Estos métodos comprenden la determinación de uno o varios ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor y/o la determinación de los antígenos asociados al tumor codificados y/o de los péptidos derivados de los mismos. Una determinación del ácido nucleico se puede efectuar de manera convencional, incluida mediante la reacción en cadena de la polimerasa o la hibridación con una sonda marcada. Una determinación de los antígenos asociados a un tumor o de los péptidos derivados de los mismos se puede efectuar mediante un rastreo de los antisueros del paciente para reconocer el antígeno y/o los péptidos. También se puede efectuar mediante un rastreo de las células T del paciente respecto a la especificidad del respectivo antígeno asociado al tumor.

La presente enseñanza también hace posible aislar proteínas que se unen a los antígenos asociados a un tumor descritos en la presente memoria, incluidos los anticuerpos y las parejas de enlace celulares de los antígenos asociados a tumores.

En el presente documento también se proporcionan polipéptidos «dominantemente negativos» en determinadas formas de realización, los cuales provienen de antígenos asociados a tumores. Un polipéptido dominantemente negativo es una variante inactiva de una proteína que, mediante la interacción con la maquinaria celular, desplaza la interacción de una proteína activa con la maquinaria celular o compite con la proteína activa, con lo que se reduce el efecto de la proteína activa. Por ejemplo, un receptor dominantemente negativo que se une a un ligando, pero que no produce ninguna señal en reacción al enlace del ligando, puede reducir el efecto biológico del ligando. De forma similar, una cinasa dominantemente negativa y catalíticamente inactiva que interactúa normalmente con proteínas diana, pero que no fosforila las proteínas diana, puede reducir la fosforilación de las proteínas diana en reacción a una señal celular. De forma similar, un factor de transcripción dominantemente negativo que se une a un punto promotor en la región de control de un gen, pero que no aumenta la transcripción del gen, puede reducir el efecto de un factor de transcripción normal ocupando puntos de unión del promotor sin aumentar la transcripción.

El resultado de la expresión en una célula de un polipéptido dominantemente negativo es una reducción de la función de las proteínas activas. El experto en la materia puede preparar variantes dominantemente negativas de una proteína, por ejemplo, mediante métodos de mutagénesis convencionales y valorando el efecto dominantemente negativo del polipéptido de la variante.

La enseñanza divulgada también comprende sustancias, como polipéptidos, que se unen a antígenos asociados a un tumor. Las sustancias de enlace de este tipo se pueden usar, p. ej., en ensayos de rastreo para una detección de los antígenos asociados al tumor y de complejos de antígenos asociados a tumores con sus parejas de enlace, así como en una purificación de los antígenos asociados al tumor y de los complejos de los mismos con sus parejas de enlace. Las sustancias de este tipo también se pueden usar para una inhibición de la actividad de los antígenos asociados al tumor, p. ej., mediante un enlace a tales antígenos.

Por ello, según la invención, se comprenden sustancias de unión, como p. ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que presentan la capacidad de unirse de forma selectiva a antígenos asociados al tumor. Los anticuerpos comprenden anticuerpos policlonales y monoclonales que se preparan de forma convencional.

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

Los antisueros que incluyen anticuerpos específicos que se unen de forma específica a la proteína diana se pueden preparar mediante distintos métodos estándares, cp., 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. Así, también es posible generar anticuerpos afines y específicos que reconozcan proteínas membranarias 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). Ello es importante sobre todo para la preparación de anticuerpos que se deban emplear de forma terapéutica, pero también para muchos usos diagnósticos. Para ello, se puede inmunizar tanto con toda la proteína, con secuencias parciales extracelulares, como con células que expresen la molécula diana de forma fisiológicamente plegada.

Tradicionalmente, los anticuerpos monoclonales se han construido utilizando la tecnología de hibridomas (para detalles técnicos, véase «Monoclonal Antibodies: A Practical Approach» de Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9; «Antibodies: A Laboratory Manual» de Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142, «Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447).

Se sabe que solo una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el parátopo, participa en la unión del anticuerpo a su epítopo (cp. Clark, W.R. (1986), The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991), Essential Immunology, 7.ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc son, p. ej., efectores de la cascada del complemento, pero no participan en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha separado enzimáticamente la región pFc' o que se ha preparado sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')2, contiene los dos puntos de enlace a antígenos de un anticuerpo completo. De forma similar, un anticuerpo del que se ha separado enzimáticamente la región Fc o que se ha preparado sin la región Fc, denominado fragmento Fab, contiene un punto de unión a un antígeno de una molécula de un anticuerpo intacta. Por otra parte, los fragmentos Fab están formados por una cadena ligera de un anticuerpo unida de forma covalente y una parte de la cadena pesada del anticuerpo, denominada Fd. Los fragmentos Fd son los determinantes principales de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd se puede asociar con hasta diez cadenas ligeras distintas, sin modificar la especificidad del anticuerpo) y, en caso de aislamiento, los fragmentos Fd conservan la capacidad de unirse a un epítopo.

Dentro de la parte de un anticuerpo que se une a un antígeno se encuentran regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que interactúan directamente con el epítopo del antígeno y regiones de armazón (FR) que mantienen la estructura terciaria del parátopo. Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobinas IgG se encuentran cuatro regiones de armazón (FR1 a FR4) que están separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR y, particularmente, las regiones CDR3 y, aún más, la región CDR3 de la cadena pesada son las principales responsables de la especificidad de los anticuerpos.

Se sabe que las regiones distintas de CDR de un anticuerpo de mamífero se pueden sustituir por regiones parecidas de anticuerpos con la misma o con otra especificidad, de forma que se conserva la especificidad del epítopo del anticuerpo original. Ello hizo posible el desarrollo de los denominados anticuerpos «humanizados», en los que se enlazan de forma covalente CDR distintas de las humanas con regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para preparar un anticuerpo funcional.

Ello utiliza la denominada tecnología «SLAM». En este sentido, se aíslan células B de sangre entera y las células se monoclonan. A continuación, el residuo de la célula B aislada se analiza respecto a su especificidad de anticuerpo. Posteriormente, al contrario de la tecnología de hibridomas, se amplifica la región variable del gen de anticuerpo mediante una célula PCR aislada 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, WO 92/04381 describe la preparación y el uso de anticuerpos de VSR humanizados de ratones, en los que al menos una parte de las regiones FR del ratón se sustituyó por regiones FR de origen humano. Los anticuerpos de este tipo, incluidos los fragmentos de anticuerpos intactos con una capacidad de unirse a antígenos, se suelen denominar «quimeras».

Según la invención, también se proporcionan fragmentos $F(ab')_2$, Fab, Fv, y Fd de anticuerpos, anticuerpos quiméricos en los que se han sustituido las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmento F(ab')2 en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmento Fab en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos quiméricos de fragmento Fd en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas. Según la divulgación, también están comprendidos los denominados anticuerpos monocatenarios.

Según la divulgación, también están comprendidos los polipéptidos que se unen de forma específica a los antígenos asociados a un tumor. Por ejemplo, se pueden proporcionar sustancias de unión de polipéptidos de este tipo mediante colecciones redundantes de péptidos que se pueden preparar sencillamente en solución de forma inmovilizada o como colecciones de expresión en la superficie de fagos. También se pueden preparar colecciones combinatorias de péptidos con uno o varios aminoácidos. Asimismo, se pueden preparar colecciones de peptoides y restos sintéticos no peptídicos.

La expresión en la superficie de fagos puede resultar especialmente eficaz en la identificación de péptidos de unión según la invención. Así, por ejemplo, se prepara una colección de fagos (utilizando, por ejemplo, el fago m13, fd o lambda) que presenta inserciones de una longitud de 4 a, aproximadamente 80 restos de aminoácidos. Después, se seleccionan fagos que soportan inserciones que se unen al antígeno asociado al tumor. Este proceso se puede repetir en varios ciclos de una reselección de fagos que se unen al antígeno asociado al tumor. Las rondas repetidas provocan una acumulación de los fagos que soportan determinadas secuencias. Se puede efectuar un análisis de las secuencias de ADN para identificar las secuencias de los polipéptidos expresados. Se puede determinar la porción lineal mínima de la secuencia que se une al antígeno asociado al tumor. También se puede usar el «sistema de doble híbrido» en levadura para identificar polipéptidos que se unen a un antígeno asociado a un tumor. Según la invención, se pueden emplear los antígenos asociados a un tumor descritos o los fragmentos de los mismos para un rastreo de las colecciones de péptidos, incluidas las colecciones de expresión en la superficie de fagos, para identificar y seleccionar parejas de enlace de péptidos de los antígenos asociados a tumores. Las moléculas de este tipo se pueden usar, por ejemplo para ensayos de rastreo, protocolos de purificación, para una interferencia con la función del antígeno asociado al tumor y para otros fines conocidos por el experto en la materia.

Los anticuerpos descritos anteriormente y otras moléculas de unión se pueden usar, por ejemplo, para identificar un tejido que exprese un antígeno asociado a un tumor. Los anticuerpos también se pueden ligar a sustancias diagnósticas específicas para una representación de las células y los tejidos que expresen antígenos asociados a un tumor. Asimismo, se pueden ligar a sustancias útiles desde un punto de vista terapéutico. Las sustancias diagnósticas comprenden, de forma no limitativa, sulfato de bario, ácido de iocetamina, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y productos radioactivos para diagnóstico, incluidos los emisores de positrones, como el flúor 18 y el carbono 11, los emisores de rayos gamma, como el yodo 123, el tecnecio 99m, el yodo 131 y el indio 111, así como los núclidos para la resonancia magnética nuclear, como el flúor y el gadolinio. El término «sustancia útil desde un punto de vista terapéutico» significa, según la invención, cualquier molécula terapéutica que, según se desee, se conduce de forma selectiva a una célula que exprese uno o varios antígenos asociados a un tumor, incluidos los agentes contra el cáncer, los enlaces provistos de yodo radioactivo, las toxinas, los fármacos citostáticos o citolíticos, etc. Los agentes contra el cáncer comprenden, por ejemplo, aminoglutetimida, l azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfano, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabidina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubina, daunorubicina, taxol, etopósido, fluoruracilo, interferón-α, lomustina, mercaptopurina, metotrexato, mitotano, procarbazina HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina y sufato de vincristina. Otros agentes contra el cáncer se han descrito en, por ejemplo Goodman y Gilman, «The Pharmacological Basis of Therapeutics», 8.ª edición 1990, McGraw-Hill, Inc., particularmente, Capítulo 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner)). Las toxinas pueden ser proteínas, como la proteína antiviral de hierba camín, la toxina colérica, la toxina pertussis, la ricina, la gelonina, la abrina, la exotoxina diftérica o la exotoxina de Pseudomonas. Los restos de toxina también pueden ser radionúclidos emisores de alta energía, como el cobalto 60.

Según la divulgación, el término «paciente» significa un ser humano, un primate no humano u otro animal, particularmente, un mamífero, como una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro un gato o un roedor, como un ratón o una rata. En una forma de realización especialmente preferida, el paciente es un ser humano.

Según la invención, el término «enfermedad» se refiere a cualquier estado patológico en el que se expresan o se expresan de forma anómala antígenos asociados a un tumor. Según la divulgación, el término «expresión anómala» significa que la expresión está modificada, preferentemente, aumentada respecto al estado en un individuo sano. Un aumento de la expresión se refiere a un aumento de al menos el 10 %, particularmente, al menos el 20 %, al menos el 50 % o al menos el 100 %. En una forma de realización, el antígeno asociado al tumor solo se expresa en el tejido de un individuo con la enfermedad, mientras que la expresión está reprimida en un individuo sano. Un ejemplo de una enfermedad de este tipo es el cáncer, de forma que el término «cáncer» comprende, según la invención, leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, gliomas, cáncer de riñón, cáncer de glándulas suprarrenales, cáncer de tiroides, cáncer de intestino, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer de los ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovarios y cáncer de pulmón, así como sus metástasis.

Según la invención, una muestra biológica puede ser una muestra de tejido y/o celular, y se puede obtener de forma convencional para usarla en los distintos métodos descritos en el presente documento, como mediante biopsia de tejidos, incluida la biopsia con sacabocados, y la extracción de sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales.

Según la divulgación, el término «célula inmunorreactiva» significa una célula que, con la estimulación adecuada, puede madurar hasta convertirse en una célula del sistema inmunitario (como una célula B, célula T colaboradora o célula T citolítica). Las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34+, células T maduras y no maduras, así como células B maduras y no maduras. En el caso de que se desee preparar células T citolíticas o colaboradoras que reconozcan un antígeno asociado a un tumor, la célula inmunorreactiva se pone en contacto con una célula que expresa un antígeno asociado a un tumor en condiciones que favorecen una producción, diferenciación y/o selección de células T citolíticas y colaboradoras. En una exposición frente a un antígeno, la diferenciación de las progenitoras de célula T en una célula T citolítica es parecida a la selección clonal del sistema inmunitario.

Algunos métodos terapéuticos se basan en una reacción del sistema inmunitario de un paciente que provoca una lisis de las células que presentan un antígeno, como las células cancerosas que presentan uno o varios antígenos asociados al tumor. Así, por ejemplo, los linfocitos T citotóxicos autólogos que son específicos de un complejo de un antígeno asociado a un tumor y una molécula del MHC se administran a un paciente con una anomalía celular. Se conoce la producción in vitro de los linfocitos T citotóxicos de este tipo. Un ejemplo de un método para la diferenciación de las células T se encuentra en WO-A-9633265. En líneas generales, se extrae una muestra de células, como células de la sangre, del paciente, y las células se ponen en contacto con una célula que presenta el complejo y que puede activar una multiplicación de los linfocitos T citotóxicos (p. ej., células dendríticas). La célula diana puede ser una célula transferida, como una célula COS. Estas células transferidas presentan el complejo deseado en su superficie celular y, en el caso de un contacto con los linfocitos T citotóxicos, estimulan su multiplicación. Después, los linfocitos T citotóxicos autólogos expandidos se administran al paciente.

En otro método para la selección de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno se utilizan tetrámeros fluorógenos de complejos de moléculas del MHC de clase I/péptidos para una detección de los clones específicos de los linfocitos T citotóxicos (Altman et al., Science 274:94-96, 1996; Dunbar et al., Curr. Biol. 8:413-416, 1998). Las moléculas del MHC de clase I solubles se pliegan in vitro en presencia de β2-microglobulina y un antígeno peptídico que se une a la molécula de clase I. Después de la purificación de los complejos de MHC/péptidos, estos se marcan con biotina. Los tetrámeros se forman mezclando los complejos MHC-péptidos biotinilados con avidina marcada (p. ej., ficoeritrina) en una relación molar de 4:1. Después, los tetrámeros se ponen en contacto con linfocitos T citotóxicos, como la sangre periférica o los ganglios linfáticos. Los tetrámeros se unen a linfocitos T citotóxicos que reconocen el complejo de antígeno peptídico/MHC de clase I. Las células que se unen a los tetrámeros se pueden clasificar mediante clasificación celular basada en fluorescencia para un aislamiento de los linfocitos T citotóxicos reactivos. Después, los linfocitos T citotóxicos aislados se pueden multiplicar in vitro.

En un método terapéutico conocido como 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 las células que presentan el complejo deseado (p. ej., células dendríticas) con linfocitos T citotóxicos del paciente que tratar, lo que da lugar a una multiplicación de los linfocitos T citotóxicos específicos. Después, los linfocitos T citotóxicos multiplicados se administran a un paciente con una anomalía celular que se distingue por determinadas células anómalas que presentan el complejo específico. Después, los linfocitos T citotóxicos lisan las células anómalas, con lo que se consigue un efecto terapéutico deseado.

A menudo, solo se pueden multiplicar las células del repertorio de la célula T de un paciente con una afinidad reducida frente a un complejo específico de este tipo, puesto que las que tienen una afinidad elevada son exterminadas por el desarrollo de la tolerancia. En este caso, una alternativa puede ser una transferencia del propio receptor de la célula T. Para ello, se combinan igualmente células que presentan el complejo deseado (p. ej., células dendríticas) con linfocitos T citotóxicos de personas sanas o de otra especie (p. ej., ratón). Ello da lugar a una multiplicación de linfocitos T citotóxicos específicos de alta afinidad si los linfocitos T proceden de un organismo donante que no había tenido ningún contacto hasta el momento con el complejo específico. Se clona el receptor de célula T de alta afinidad de estos linfocitos T específicos multiplicados. En el caso de que los receptores de la célula T de alta afinidad hayan sido clonados de otra especie, estos se pueden humanizar en distinta medida. En ese momento, los receptores de la célula T de este tipo se transducen a las células T del paciente mediante transferencia génica, p. ej., con vectores retrovirales. En ese momento, se efectúa la transferencia adoptiva con estos linfocitos T modificados genéticamente (Stanislawski et al., Nat Immunol. 2:962-70, 2001; Kessels et al., Nat Immunol. 2:957-61, 2001).

Los aspectos terapéuticos anteriores parten de que al menos algunas de las células anómalas del paciente presentan un complejo de un antígeno asociado a un tumor y una molécula HLA. Una identificación de las células de este tipo se puede desarrollar de forma conocida. Nada más identificarse las células que presentan el complejo se pueden combinar con la muestra del paciente que incluye linfocitos T citotóxicos. En el caso de que las células que presentan al complejo estén lisadas por los linfocitos T citotóxicos, se puede suponer que se presenta un antígeno asociado a un tumor.

La transferencia adoptiva no es el único tipo de terapia que se puede aplicar según la invención. Los linfocitos T citotóxicos también se pueden generar in vivo de forma conocida por sí misma. En un método se usan células no proliferativas que expresan el complejo. Las células que se usan en este caso serán aquellas que expresan normalmente el complejo, como las células tumorales tratadas con radioterapia o células a las que se han transferido uno o los dos genes que son necesarios para una presentación del complejo (esto es, el péptido antígeno y la molécula HLA presentadora). Se pueden emplear distintos tipos de células. Por otra parte, se pueden usar vectores que contienen uno o los dos genes de interés. Se prefieren especialmente los vectores virales y bacterianos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor o una parte del mismo se pueden vincular de forma funcional con secuencias promotoras y potenciadoras que dirigen una expresión del antígeno asociado al tumor o un fragmento del mismo en determinados tejidos o tipos de células. El ácido nucleico se puede integrar en el sector de expresión. Los vectores de expresión pueden ser ácidos nucleicos extracromosómicos no modificados, plásmidos o genomas virales en los que es posible una inserción de ácidos nucleicos exógenos. Los ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor también se pueden insertar en un genoma retroviral, lo que hace posible la integración del ácido nucleico en el genoma del tejido diana o de la célula diana. En estos sistemas, un microorganismo, como un virus de la vaccinia, un poxvirus, un virus del herpes simple, un retrovirus o un adenovirus, soporta el gen de interés e «infecta» de facto a las células huésped. Otra forma preferida es la introducción del antígeno asociado al tumor en forma de ARN recombinante. Este se puede incorporar en las células, p. ej., mediante transferencia liposómica o mediante electroporación. Las células resultantes presentan el complejo de interés y son reconocidas por los linfocitos T citotóxicos autólogos que se multiplican después.

Un efecto similar se puede alcanzar combinando el antígeno asociado al tumor o un fragmento del mismo con un adyuvante para permitir una integración in vivo en células que presenten un antígeno. El antígeno asociado al tumor o un fragmento del mismo se pueden representar en forma de proteína, de ADN (p. ej., dentro de un vector) o en forma de ARN. El antígeno asociado al tumor se procesa para dar como resultado un compañero peptídico para la molécula HLA, mientras que un fragmento del mismo se puede presentar sin que sea necesario ningún otro procesamiento. Esto último se da particularmente si estos se pueden unir a las moléculas HLA. Se prefieren las formas de administración en las que el antígeno in vivo es procesado en su conjunto por una célula dendrítica, puesto que, en este caso, también pueden surgir células T colaboradoras. Estas son necesarias para una respuesta inmunitaria efectiva (Ossendorp et al., Immunol Lett. 74:75-9, 2000; Ossendorp et al., J. Exp. Med. 187:693-702, 1998). En general, una cantidad eficaz del antígeno asociado al tumor se puede administrar a un paciente, p. ej., mediante una inyección intradérmica. No obstante, la inyección también se puede efectuar de

forma intraganglionar en un ganglio linfático (Maloy et al., Proc Natl Acad Sci USA 98:3299-303, 2001). También se puede efectuar en combinación con reactivos que faciliten una aceptación en las células dendríticas. Los antígenos asociados a tumores preferidos comprenden aquellos que reaccionan con antisueros de cáncer alógenos o con células T de muchos pacientes de cáncer. No obstante, son de especial interés aquellos contra los que no existe ninguna respuesta inmunitaria espontánea. Contra estos se pueden inducir de forma detectable respuestas inmunitarias que pueden lisar 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 se pueden emplear como vacunas para la inmunización. Los términos «inmunización» o «vacunación» significan, según la divulgación, un aumento o activación de una reacción inmunitaria frente a un antígeno. Se pueden emplear modelos de animales para probar un efecto inmunizador frente al cáncer usando un antígeno asociado a un tumor o un ácido nucleico que lo codifique. Por ejemplo, se pueden introducir células de cáncer humanas en un ratón para crear un tumor y se pueden administrar uno o varios ácidos nucleicos que codifiquen los antígenos asociados al tumor. El efecto en las células cancerosas (por ejemplo, la reducción del tamaño del tumor) se puede medir mediante el ácido nucleico como medida de la eficacia de una inmunización.

Como parte de la composición para la inmunización se administran uno o varios adyuvantes a uno o varios antígenos asociados al tumor o fragmentos estimulantes de los mismos para una inducción de una reacción inmunitaria o un aumento de una reacción inmunitaria. Un adyuvante es una sustancia que se integra en el antígeno o se administra junto con este y potencia la reacción inmunitaria. Los adyuvantes pueden potenciar la reacción inmunitaria proporcionando un depósito de antígenos (extracelular o en macrófagos), activando macrófagos y/o estimulando determinados linfocitos. Los adyuvantes son conocidos y comprenden, de forma no limitativa, el monofosforil lípido A (MPL, SmithKline Beecham), las saponinas, como QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 y QS-L1 (So et al., Mol. Cells 7:178-186, 1997), el adyuvante de Freund incompleto, el adyuvante de Freund completo, la vitamina E, el Montanide, el alumbre, los oligonucleótidos CpG (cp. Kreig et al., Nature 374:546-9, 1995) y distintas emulsiones del tipo agua en aceite que se pueden preparar a partir de aceites degradables, como el escualeno y/o el tocoferol. Preferentemente, los péptidos se administran en una mezcla con DQS21/MPL. Normalmente, la relación de DQS21 a MPL es de, alrededor de 1:10 a 10:1, preferentemente, de alrededor de 1:5 a 5:1 y, particularmente, de alrededor de 1:1. Normalmente, para una administración a los seres humanos, DQS21 y MPL se encuentran en una formulación de vacuna en un intervalo de alrededor de 1 µg hasta alrededor de 100 µm.

También se pueden administrar otras sustancias que estimulen una reacción inmunitaria del paciente. Por ejemplo, se pueden usar citocinas en una vacunación debido a sus propiedades reguladoras en los linfocitos. Las citocinas de este tipo comprenden, p. ej., la interleucina 12 (IL-12), de la que se ha demostrado que potencia los efectos protectores de las vacunas (cp. Science 268:1432-1434, 1995), el GM-CSF y la IL-18.

Existe una serie de uniones que potencian una reacción inmunitaria y que, por ello, se pueden emplear en una vacunación. Estas comprenden las moléculas coestimuladoras que se proporcionan en forma de proteínas o ácidos nucleicos. Las moléculas coestimuladoras de este tipo son, por ejemplo, B7-1 y B7-2 (CD80 y CD86), que se expresan en células dendríticas (DC) e interactúan con la molécula CD28 expresada en las células T. Esta interacción proporciona una coestimulación (señal 2) para una célula T estimulada por el antígeno/MHC/TCR (señal 1), con lo que se potencia la multiplicación de la célula T y la función efectora. B7 también interactúa con CTLA4 (CD152) en las células T, y algunos análisis que incluyen los ligandos CTLA4 y B7 muestran que la interacción B7-CTLA4 puede potenciar una inmunidad contra un tumor y una multiplicación de CTL (Zheng, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(11):6284-6289 (1998)).

Normalmente, B7 no se expresa en las células tumorales, de forma que estas no son células presentadoras de antígeno (APC) eficaces para las células T. Una inducción de la expresión de B7 haría posible que las células tumorales estimularan de forma más eficaz una multiplicación de los 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 de las citocinas Thl en una población de células T, lo que da lugar a una actividad de las células T aún más potenciada (Gajewski et al., J. Immunol. 154:5637-5648 (1995)).

Una activación completa de los linfocitos T citotóxicos y una función efectora completa requieren una participación de las células T colaboradoras mediante la interacción entre el ligando CD40 en las células T colaboradoras y la molécula CD40 que es expresada por las 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 las IL-6/IL-12 asociadas por las células dendríticas (células presentadoras de antígeno). Así, la interacción CD40-CD40L complementa las interacciones de la señal 1 (antígeno/MHC-TCR) y de la señal 2 (B7-CD28).

Según las expectativas, el uso de anticuerpos anti-CD40 para una estimulación de las células dendríticas potenciaría directamente una reacción frente a los antígenos del tumor que, normalmente, se encuentran fuera del alcance de una reacción inflamatoria o son presentados por células presentadoras de antígenos no profesionales (células tumorales). En estas situaciones no se proporcionan señales coestimuladoras de T colaboradoras y B7. Este mecanismo se podría usar en el contexto de las terapias que se basan en las células dendríticas cargadas con antígenos.

Según la divulgación también se prevé una administración de ácidos nucleicos, polipéptidos o péptidos. La administración de polipéptidos y péptidos se puede efectuar de una forma conocida por sí misma. En una forma de realización, la administración de los ácidos nucleicos se efectúa mediante métodos ex vivo, esto es, retirando las células de un paciente, modificación genética de las células para integrar un antígeno asociado a un tumor y reintroducción de las células modificadas en el paciente. En general, ello comprende la introducción in vitro de una copia funcional de un gen en las células de un paciente y la recirculación de las células modificadas genéticamente en el paciente. La copia funcional del gen se encuentra bajo el control funcional de elementos reguladores que permiten una expresión del gen en las células modificadas genéticamente. Los métodos de transfección y de transducción son conocidos por el experto en la materia. Según la divulgación se prevé también una administración in vivo de ácidos nucleicos utilizando vectores, como virus y liposomas orientados.

En una forma de realización preferida, se selecciona un vector viral del grupo formado por adenovirus, virus adeno-asociados, poxvirus, incluido el virus de la vaccinia y los poxvirus atenuados, el virus del bosque de Semliki, los retrovirus, los virus Sindbis y las partículas similares al virus Ty para la administración de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor. Son especialmente preferidos los adenovirus y los retrovirus. Por lo general, los retrovirus son de replicación deficiente (es decir, son incapaces de generar partículas infecciosas).

Se pueden emplear distintos métodos para introducir ácidos nucleicos, in vitro o in vivo, en células según la divulgación. Los métodos de este tipo comprenden la transfección de precipitados de ácido nucleico-CaPO4, la transfección de ácidos nucleicos asociados a DEAE, la transfección o la infección con los virus anteriores que contienen los ácidos nucleicos de interés, la transfección facilitada por liposomas y similares. En determinadas formas de realización se prefiere dirigir el ácido nucleico a determinadas células. En las formas de realización de este tipo, un vehículo que se emplee para administrar un ácido nucleico a una célula (p. ej., un retrovirus o un liposoma) puede presentar una molécula unida de manipulación dirigida. Por ejemplo, una molécula en forma de un anticuerpo que sea específico de una proteína de la membrana superficial de la célula diana o un ligando se puede integrar en el vehículo del ácido nucleico o se puede unir al mismo para un receptor de la célula diana. Los anticuerpos preferidos comprenden anticuerpos que se unen de forma selectiva a un antígeno asociado a un tumor. En el caso de que se desee una administración de un ácido nucleico mediante liposomas, se pueden integrar proteínas que se unan a una proteína de la membrana superficial asociada con la endocitosis en la formulación de los liposomas para hacer posible una manipulación dirigida y/o una aceptación. Las proteínas de este tipo comprenden proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas que son específicas de un tipo determinado de célula, los anticuerpos contra las proteínas que se internalizan, las proteínas que se dirigen a un punto intracelular y similares.

Las composiciones terapéuticas según la divulgación se pueden administrar en preparaciones farmacéuticamente compatibles. Las preparaciones de este tipo pueden contener concentraciones farmacéuticamente compatibles de sales, tampones, conservantes, vehículos, sustancias complementarias aumentadoras de la inmunidad, como los adyuvantes, CpG y citocinas, y, en su caso, otros principios activos terapéuticos.

Los principios activos terapéuticos se pueden administrar de cualquier manera convencional, incluida la inyección o la infusión. La administración se puede efectuar, por ejemplo, por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o transdérmica. Preferentemente, la administración terapéutica de anticuerpos se efectúa mediante un aerosol pulmonar. Preferentemente, la administración de ácidos nucleicos no codificantes se efectúa mediante una administración intravenosa lenta.

Las composiciones se administran en cantidades eficaces. Una «cantidad eficaz» se refiere a la cantidad que, sola o en combinación con otras dosis, hace que se logre una reacción deseada o un efecto deseado. En el caso de un tratamiento de una enfermedad determinada o de una afección determinada que se distinga por la expresión de uno o varios antígenos asociados a un tumor, la reacción deseada se refiere a la inhibición del desarrollo de la

enfermedad. Ello comprende la desaceleración del avance de la enfermedad y, particularmente, una interrupción del avance de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser el retraso de la aparición o un impedimento de la aparición de la enfermedad o de la afección.

Una cantidad eficaz de una composición según la invención dependerá de la afección que tratar, de la severidad de la enfermedad, de los parámetros individuales del paciente, incluidos la edad, el estado psicológico, la altura y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia complementaria (si se da el caso), la vía de administración específica y factores similares.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas son estériles y contienen una cantidad eficaz de la sustancia terapéuticamente eficaz para la generación de la reacción deseada o del efecto deseado.

Las dosis de las composiciones que se administran pueden depender de distintos parámetros, como el tipo de administración, el estado del paciente, el periodo de administración deseado, etc. En el caso de que una reacción en el paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden emplear dosis más elevadas (o dosis con una efectividad más elevada que se logren mediante otra vía de administración más localizada).

En general, para el tratamiento o para la generación o el aumento de una reacción inmunitaria se formulan y se administran dosis de 1 ng a 1 mg, preferentemente, de 10 ng a 100 µg del antígeno asociado al tumor. En el caso de que se desee la administración de ácidos nucleicos (ADN y ARN) que codifiquen los antígenos asociados al tumor, se formulan y administran dosis de 1 ng a 0,1 mg.

En general, las composiciones farmacéuticas se administran en cantidades farmacéuticamente compatibles y en composiciones farmacéuticamente compatible. El término «farmacéuticamente compatible» se refiere a un material no tóxico que no interactúa con el efecto del principio activo de la composición farmacéutica. Por lo común, las composiciones de este tipo pueden incluir sales, tampones, conservantes, vehículos y, en su caso, otros principios activos terapéuticos. Para usarlas en medicina, las sales tienen que ser farmacéuticamente compatibles. No obstante, se pueden usar sales que no sean farmacéuticamente compatibles para preparar sales de las mismas farmacéuticamente compatibles y están comprendidas según la invención. Las sales farmacéutica y farmacológicamente compatibles de este tipo comprenden, de forma no limitadora, aquellas que se han preparado partiendo de los siguientes ácidos: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido maleico, ácido acético, ácido salicílico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido malónico, ácido succínico y similares. Las sales farmacéuticamente compatibles también se pueden preparar como sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, como las sales sódicas, potásicas o cálcicas.

Una composición farmacéutica según la divulgación puede comprender un vehículo farmacéuticamente compatible. Según la divulgación, el término «vehículo farmacéuticamente compatible» se refiere a uno o más ingredientes de relleno, diluyentes o sustancias encapsuladas sólidas o líquidas compatibles que sean adecuadas para una administración a un ser humano. El término «vehículo» se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de tipo natural o sintetizado, en el que el componente activo se combina para facilitar una aplicación. Por lo común, los componentes de la composición farmacéutica se conciben de forma que no se produzca ninguna interacción que afecte esencialmente a la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir tampones adecuados, 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, en su caso, contener conservantes adecuados, como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal.

Habitualmente, las composiciones farmacéuticas se presentan en forma de dosis unitarias y se pueden preparar de forma conocida. Las composiciones farmacéuticas según la divulgación se pueden encontrar, por ejemplo, en forma de cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones, jarabes, elixires o en forma de emulsión.

Habitualmente, las composiciones que son adecuadas para una administración parenteral comprenden una preparación estéril acuosa o no acuosa del principio activo que, preferentemente, es isotónica respecto a la sangre del receptor. Ejemplos de vehículos y disolventes compatibles son una solución de Ringer y una solución de cloruro sódico isotónica. Además, normalmente, se emplean aceites fijados estériles como medio de solución o de suspensión.

La presente invención se describe de forma detallada mediante las siguientes figuras y los siguientes ejemplos meramente ilustrativos y que no deben entenderse como limitadores de la invención. El experto en la materia deducirá otras formas de realización de la descripción y los ejemplos.

Figuras:

Fig. 1. Expresión de la claudina 18A2.1 en el estómago y en el esófago, así como en los tumores de estómago y de páncreas

El análisis de RT-PCR con cebadores específicos de claudina 18A2.1 (SEQ ID NO: 39, 40) mostró según la invención una expresión pronunciada de la claudina 18A2.1 en 8/10 biopsias en tumor de estómago así como en 3/6 biopsias de tumor de páncreas. También se halló una expresión significativa en los tejidos normales de estómago y esófago. Por el contrario, no se detectó ninguna expresión en el ovario ni en tumores de ovario.

Fig. 2. Representación esquemática de conformaciones de claudina 18.

Según la invención, el polipéptido de la claudina 18A2 puede encontrarse en la célula en dos conformaciones. En la conformación 1, la proteína se encuentra en forma de molécula de membrana con 4 dominios transmembranarios (TM) y presenta dos dominios distintos, situados de forma extracelular. En la conformación 2, las dos zonas medias hidrófobas (h-fob) no ejercen ninguna función del dominio transmembranario. De esta forma, en comparación con la conformación 1, en esta conformación no se sitúa ninguna región peptídica adicional de forma extracelular. Además, de esta conformación resulta un punto de N-glucosilación adicional en la posición 116 (flecha más gruesa). En la parte inferior de la figura se enumeran todos los dominios de glucosilación previstos. Ex1: dominio extracelular 1, Ex2: dominio extracelular 2, TM: dominio transmembranario, h-fob: región hidrófoba extracelular.

Fig. 3. Expresión cuantitativa de la claudina 18, variante A1

No se puede detectar la claudina 18A1 en ningún tejido normal, excepto en el tejido de pulmón y estómago. La claudina 18A1 se expresa en gran medida en una pluralidad de tejidos tumorales. Se encuentra una expresión especialmente fuerte en tumores de estómago, tumores de pulmón, tumores de páncreas y tumores de esófago.

Fig. 4. Expresión cuantitativa de la claudina 18, variante A2

No se puede detectar la claudina 18A2 en ningún tejido normal, excepto en el tejido de estómago. La claudina 18A2 se expresa en una pluralidad de tejidos tumorales, particularmente, en tumores de estómago, tumores de pulmón, tumores de páncreas y tumores de estómago.

Fig. 5. Uso de anticuerpos específicos de la claudina 18A2 (dominio extracelular)

A: Tinción de células de tumor de estómago positivas en claudina 18A2 (SNU-16, fijadas con metanol) con un anticuerpo que se preparó mediante inmunización con un péptido (SEQ ID NO: 17). Aparece una fuerte tinción de la membrana en las zonas de interacción célula/célula. La proteína se agrega en las zonas focales de la membrana.
B, C, D: Detección de la especificidad del anticuerpo mediante análisis de colocalización en células T 293 de claudina 18A2 con transferencia de GFP. B: fluorescencia de GFP; C: anti-claudina 18A2; D: superposición.

Fig. 6. Uso de anticuerpos específicos de la claudina 18A2 (dominio extracelular)

Tinción de la membrana de células de tumor de estómago positivas en claudina 18A2 (SNU-16) con un anticuerpo que se preparó mediante inmunización con un péptido (SEQ ID NO: 113, dominio extracelular situado de forma N-terminal). Para la contratinción se utilizó un anticuerpo monoclonal que está dirigido contra la E-cadherina. A: anticuerpo de la claudina anticuerpo 18A2; B: contratinción de anti-E-cadherina; C: superposición.

Fig. 7. Uso de anticuerpos contra el dominio extracelular C-terminal de la claudina 18

Imágenes de la izquierda: Tinción de la membrana de las células del tumor de pulmón positivas en claudina 18A2 (SNU-16) con un anticuerpo que se preparó mediante la inmunización con un péptido (SEQ ID NO: 116, dominio extracelular situado de forma C-terminal). Para la contratinción se utilizó un anticuerpo monoclonal que está dirigido contra la E-cadherina (imágenes de la derecha).

Fig. 8. Uso de anticuerpos específicos de la claudina 18A1

Arriba: tinción débil a inexistente de las células de tumor de estómago (SNU-16, positivas en claudina 18A2) con un anticuerpo que se preparó mediante inmunización con un péptido específico de la claudina 18A1 (SEQ ID NO: 115). A: anti-E-cadherina; B: anti-claudina 18A1; C: superposición.

Abajo: detección de la especificidad del anticuerpo mediante análisis de colocalización en células T 293 de la claudina 18A1 con transferencia de GFP. A: fluorescencia de GFP; B: anti-claudina 18A1; C: superposición.

Fig. 9. Detección de la claudina 18A2 en el método Western blot.

Método Western blot con lisados de distintos tejidos sanos con un anticuerpo específico de la claudina 18A2 dirigido contra el epítopo de SEQ ID NO: 17. 1: tejido normal gástrico; 2: testicular; 3: cutáneo; 4: pectoral; 5: hepático; 6: colónico; 7: pulmonar; 8: renal; 9: ganglionar.

Fig. 10. Método Western blot de la claudina 18A2 con muestras de estómago y de tumores de estómago, así como distintas líneas celulares.

Se transfirieron lisados de estómago y de tumores de estómago (A, B) y líneas celulares tumorales (C, D), y se analizaron con un anticuerpo específico de la claudina 18A2 contra el epítopo de SEQ ID NO: 17. Los tumores de estómago presentan una forma menos glucosilada de la claudina 18A2. Un tratamiento de lisados de estómago con PNGase F provoca la formación de la forma con glucosilación baja.

A: 1: tejido normal gástrico #A; 2: tumor de estómago #A; 3: tejido normal gástrico #B; 4: tumor de estómago #B
B: 1: tejido normal gástrico #A; 2: tejido normal gástrico #B; 3: tejido normal gástrico #B + PNGase F; 4: tumor de estómago #C; 5: tumor de estómago #D; 6: tumor de estómago #D + PNGase F
C: 1: tejido normal gástrico; 2: MDA-MB-231; 3: SK-MEL-37; 4: AGS; 5: SNU-1; 6: SNU-16; 7: EFO27; 8: TOV-112D; 9: OVCAR. Se observa que las líneas celulares tumorales expresan la variante desglucosilada de la claudina 18A2.
D: Resumen en forma de tabla de los datos del método Western blot para una selección de líneas celulares que se analizaron con el anticuerpo específico de la claudina 18A2.

Fig. 11. Expresión de la claudina 18 en tumores de pulmón

Según la Fig. 30, se efectuó una detección de variantes de la claudina 18A2 con glucosilación baja en tumores de pulmón. 1: tejido normal gástrico; 2: tejido gástrico; 3 a 9: tumores de pulmón.

Fig. 12. Análisis inmunohistoquímico de la claudina 18 con anticuerpos específicos de la claudina 18A2 en tejidos normales

En la mucosa gástrica, solo se tiñen las células epiteliales diferenciadas tanto en la abertura como en la base de las glándulas. No se puede detectar la claudina 18A2 en las células madre de estómago. Todos los demás tejidos normales analizados tampoco expresan este gen, como se representa, por ejemplo, en el caso del riñón, del pulmón y del colon.

Fig. 13. Resultados de la inmunohistología con antisuero policlonal específico de la claudina 18A2

A: Ejemplos de tinciones específicas de tejidos de tumor de pulmón. Se observa que el tejido normal pulmonar que expresa la variante de la claudina 18A1 no es reconocido por el antisuero específico de la claudina 18A2.
B: Ejemplos de tinción tumoral específica de tumores de esófago Se observa que las células sanas del entorno no se tiñen.
C: Ejemplos de tinción tumoral específica de epitelios de tumor de estómago En este caso, tampoco se tiñen las células sanas del entorno.
D: Resumen ilustrativo en forma de tabla de los datos de la tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos específicos de la claudina 18A2 AdenoCa: adenocarcinoma; SCC: carcinoma de epitelio pavimentoso; RCC: carcinoma de células renales.

Fig. 14. Secuencias

Se muestran secuencias a las que se hace referencia en la presente memoria.

Fig. 15. Determinación de zonas extracelulares de la claudina 18A2

Se prepararon tres construcciones que contenían respectivamente una secuencia de marcador (identificador myc o HA) en uno de los dominios, EX1 (=dominio extracelular 1), EX2 (=dominio extracelular 2) o D3 (=dominio 3) (arriba). Estas se transfirieron a líneas celulares y se analizaron para determinar si un anticuerpo dirigido contra estas secuencias de marcador se unía a células no permeabilizadas. Ello requiere que la zona correspondiente de la proteína sea topológicamente extracelular. En la citometría de flujo se demostró que las tres zonas de la molécula eran accesibles para el anticuerpo (abajo).

Fig. 16. Topología de la membrana de la claudina 18A2

Según nuestros datos, la claudina 18A2 se puede encontrar en la conformación 2, donde los dos dominios hidrófobos internos no pueden pasar, de forma integral, a través de la membrana celular. Por ello, las zonas más grandes de esta molécula son extracelulares. En este caso también se encuentran los dominios de glucosilación que, según nuestros datos, están glucosilados en el tejido normal gástrico, pero no en los tumores. Con ello, se obtienen epítopos meramente específicos del tejido del tumor.

Fig. 17. Análisis FACS para determinar la localización extracelular de la claudina 18

La figura muestra análisis por citometría de flujo en células no permeabilizadas a las que se transfirieron claudina 18A1, claudina 18A2 y simulaciones, así como secciones de claudina 18A2. Se puede observar que los anticuerpos mAB1 y mAB2 reconocen de forma específica la claudina 18A2 (columna izquierda) y los dominios extracelulares 2 (Ex2, 3.ª columna) en la superficie celular, mientras que la claudina 18A1 (2.ª columna) y el control negativo (última columna) son negativos. El anticuerpo mAB1 se une, a diferencia del mAB2, al dominio extracelular 1 (Ex1, 4.ª columna) también de forma específica.

Ejemplos:

Material y métodos

Los términos «in silico», «electrónico» y «clonar de forma virtual» se refieren simplemente al uso de métodos basados en bases de datos con los que se pueden simular operaciones experimentales de laboratorio.

Todos los demás términos y conceptos se usan, salvo que se especifique lo contrario, de la forma en la que son conocidos por el experto en la materia. Las técnicas y los métodos nombrados se efectúan de forma conocida y se han descrito, p. ej., en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. Todos los métodos que implican el uso de kits y reactivos se desarrollan según las indicaciones del fabricante.

Estrategia para la determinación de nuevos genes asociados a tumores basada en la prospección de datos

Se combinaron dos estrategias in silico, en concreto, la búsqueda de palabras clave en GenBank y cDNA xProfiler. Se realizó una búsqueda de genes candidatos de los que se indica que se expresan de forma específica en determinados tejidos utilizando el sistema ENTREZ Search and Retrieval System del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) en la base de datos GenBank (Wheeler et al., Nucleic Acids Research 28:10-14, 2000).

Se extrajeron genes candidatos (GOI, genes of interest) de las bases de datos mediante consultas con palabras clave como, por ejemplo, «colon-specific gene», «stomachspecific gene» o «kidney-specific gene». La búsqueda se limitó a una parte de toda la información de estas bases de datos empleando como campos «homo sapiens» para el organismo y «ARNm» para el tipo de molécula.

La lista de los GOI encontrados se organizó identificando distintas denominaciones para la misma secuencia y eliminando esas redundancias.

A su vez, todos los genes candidatos obtenidos de la búsqueda de palabras clave se analizaron mediante el método «electronic Northern» (eNorthern) respecto a su distribución en el tejido. El método eNorthern se basa en comparar la secuencia de un GOI con una base de datos EST (expressed sequence tag) (Adams et al., Science 252:1651, 1991) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Se puede determinar la procedencia del tejido de cada EST obtenido como homólogo al GOI introducido y, de esta forma, mediante la suma de todos los EST se puede lograr una estimación provisional de la distribución del GOI en los tejidos. Solo se siguieron analizando los GOI que no

tenían ninguna homología con los EST de los tejidos normales no específicos de órganos. Para esta valoración también se tuvo en cuenta que existen bancos de ADNc indicados incorrectamente en el dominio público (Scheurle et al., Cancer Res. 60: 4037-4043, 2000) (www.fau.edu/cmbb/publications/cancergenes6.htm). Como segundo método de prospección de datos se utilizó el cDNA xProfiler del proyecto Cancer Genome Anatomy 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 archivados en bases de datos mediante operadores lógicos. En nuestro caso, definimos un conjunto A al que, por ejemplo se asignaron todas las colecciones de expresión preparadas de colon, excluyendo las colecciones mixtas. Al conjunto B se le asignaron todas las colecciones de ADNc que se habían preparado partiendo de tejido normal, a excepción del colon. En general, se utilizaron todos los bancos de ADNc, independientemente del método de preparación subyacente empleado, pero solo se admitieron aquellos con una cardinalidad de > 1000. A través del operador BUT NOT se restó digitalmente el conjunto B del conjunto A. Igualmente, el grupo de los GOI encontrados de esta forma se sometió a estudios eNorthern y se verificó mediante una investigación bibliográfica. Esta prospección de datos combinada incluye los aproximadamente 13.000 genes de cadena completa del dominio público y, a partir de estos, predice genes con una expresión específica potencial de un órgano.

En primer lugar, se evaluaron todos los demás genes del tejido normal mediante una RT-PCR específica. Todos los GOI que se encontraron expresados en tejidos normales no específicos de órganos se consideraron falsos positivos y se excluyeron de los análisis posteriores. Los restantes se analizaron en un gran grupo de los más diversos tejidos tumorales. Así, los antígenos representados más abajo mostraron estar activados en las células tumorales.

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

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

Se realizó una síntesis de ADNc de la primera cadena a partir de 2 a 4 µg de todo el ARN en una fórmula de reacción de 20 µl a través del Superscript II (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. 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 (codificante CGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCG, no codificante CCTAACCAGCTGCCCAACTGTAG, temperatura de hibridación 67 ºC).

Se elaboró un archivo de ADNc de la primera cadena partiendo de una serie de tejidos normales y entidades tumorales. Para los estudios de expresión se amplificaron 0,5 µl de estos ADNc en una fórmula de reacción con cebadores específicos de GOI (véase más abajo) y 1 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen). La fórmula de reacción contenía respectivamente 0,3 mM de dNTP, por cada 0,3 µM de cada cebador, y 3 µl de 10 x tampón de reacción.

Los cebadores se seleccionaron de forma que estuviesen en 2 exones distintos, y la eliminación de la interferencia mediante ADN genómico contaminante se confirmó como la causa de los resultados falsos positivos mediante una prueba del ADN transcrito no de forma inversa como plantilla. Después de 15 minutos a 95 ºC para la activación de la ADN polimerasa HotStarTaq, se realizaron 35 ciclos de PCR (1 min 94 ºC, 1 min temperatura de hibridación respectiva, 2 min 72 ºC y alargamiento final a 72 ºC durante 6 min). Se separaron 20 µl de esta reacción en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se analizaron.

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

Claudina 18A1 (64 ºC)

Codificante: 5'-GAGGCAGAGTTCAGGCTTCACCGA-3' (SEQ ID NO: 109)
No codificante: 5'-TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC-3' (SEQ ID NO: 110)

Claudina 18A2 (68 °C)

Codificante1: 5'-GGTTCGTGGTTTCACTGATTGGGATTGC-3' (SEQ ID NO: 39)
No codificante1: 5'-CGGCTTTGTAGTTGGTTTCTTCTGGTG-3' (SEQ ID NO: 40)

(continuación)

Codificante2: 5' -TGTTTTCAACTACCAGGGGC-3' (SEQ ID NO: 107)
No codificante2: 5' -TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC-3' (SEQ ID NO: 108)

Preparación de ADNc cebado con hexámeros aleatorios y PCR cuantitativa a tiempo real

Se cuantificó la expresión de varios genes a través de la PCR a tiempo real. Así, se detectaron productos de PCR con SYBR-Green como tinte indicador. La fluorescencia indicadora del SYBR-Green se suprime en una solución y el tinte no se vuelve activo hasta que se produce una unión con fragmentos de ADN bicatenario. Para la cuantificación se usa el aumento de la fluorescencia del SYBR-Green como consecuencia de la amplificación específica a través de cebadores específicos de GOI después de cada ciclo de PCR. La cuantificación de la expresión del gel diana se efectúa de forma absoluta o relativa a la expresión de un gen de control con expresión constante en los tejidos que analizar. La expresión se detectó tras la normalización de las muestras frente a ARN 18s como el denominado gen housekeeping a través del método ΔΔ-Ct (PE Biosystems, EE. UU.). Las reacciones se desarrollaron en mezclas dobles y se determinaron en triplicados. Se utilizó el kit QuantiTect SYBR-Green PCR (Qiagen, Hilden) según las indicaciones del fabricante. La síntesis del ADNc se efectuó con el High Capacity cDNA Archive Kit (PE Biosystems, EE. UU.) usando cebadores hexámeros según las indicaciones del fabricante. Se emplearon respectivamente 5 µl del ADNc diluido en 25 µl del volumen total para la PCR: cebador codificante 300 nM, cebador no codificante 300 nM; desnaturalización inicial 95 ºC 15 min; 95 ºC 30 s; hibridación 30 s; 72 ºC 30 s; 40 ciclos. Las secuencias de los cebadores usados se enumeran en los respectivos ejemplos.

Clonación y análisis de la secuencia

Se efectuó la clonación de longitudes completas o de fragmentos génicos según los métodos convencionales. Para identificar la secuencia se amplificaron los antígenos correspondientes a través de la polimerasa pfu para la corrección de errores (Stratagene). Tras finalizar la PCR, se ligó la adenosina a través de la HotStarTaq DNA Polymerase en los extremos del amplicón para clonar los fragmentos en el vector TOPO TA según las indicaciones del fabricante. La secuenciación se realizó a través de un servicio comercial. Las secuencias se analizaron mediante programas de predicción y algoritmos convencionales.

Método Western blot

Se lisan células de un cultivo celular (expresión endógena del gen diana o síntesis de la proteína diana según la transfección de un vector de expresión que codifica la proteína diana) o muestras de tejidos que podrían contener la proteína diana en una solución de SDS al 1 %. Así, el SDS desnaturaliza las proteínas incluidas en el lisado. Los lisados de una fórmula experimental se separan por electroforesis según su tamaño, dependiendo del tamaño de proteína esperado en geles de poliacrilamida (contenido de SDS del 1%) desnaturalizados del 8 al 15 % (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, SDS-PAGE). A continuación, las proteínas se transfieren mediante el método de electrotransferencia semiseca (Biorad) a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schüll) en la que se puede detectar la proteína deseada. Para ello, primero se bloquea la membrana (p. ej., con leche en polvo) y, a continuación, se incuba con el anticuerpo específico en una disolución de 1:20 a 1:200 (según la especificidad del anticuerpo) durante 60 minutos. Después de una etapa de lavado, la membrana se incuba con un segundo anticuerpo ligado a un marcador (p. ej., una encima, como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina) que reconoce al primer anticuerpo. Después de otra etapa de lavado, a continuación, la proteína diana se hace visible en la membrana en una reacción cromática o de quimioluminiscencia a través de una reacción enzimática (p. ej., ECL, Amersham Bioscience). El resultado se documenta mediante capturas con una cámara adecuada.

El análisis de las modificaciones proteínicas se efectúa normalmente en el método Western blot. Las glucosilaciones, que tienen normalmente un tamaño de varios kDa, dan lugar a una masa total mayor de la proteína diana, que se puede separar en la SDS-PAGE. Para la detección de uniones O- o N-glucosídicas específicas se incuban lisados de proteínas de tejidos o células antes de la desnaturalización mediante SDS con O- o N-glucosidasas (según las instrucciones del fabricante en cuestión, p. ej., PNgase, endoglucosidasa F, endoglucosidasa H, Roche Diagnostics). A continuación se efectúa un método Western blot como se ha descrito anteriormente. En el caso de una reducción del tamaño de una proteína diana, se puede detectar así una glucosilación específica con una glucosidasa después de la incubación y, de esta forma, analizar también la especificidad tumoral de una modificación. La posición exacta de los aminoácidos glucosilados se puede predecir con algoritmos y programas de predicción.

Inmunofluorescencia

Se usan células de líneas celulares establecidas que, o bien sintetizan la proteína diana de forma endógena (detección de ARN en la RT-PCR o de la proteína en el método Western blot), o bien se les ha transferido ADN plasmídico antes de la IF. Para la transfección de ADN en líneas celulares están bien establecidos los métodos más diversos (p. ej., electroporación, transfección basada en liposomas, precipitación con fosfato de calcio) (p. ej., Lemoine et al. Methods Mol. Biol. 1997; 75: 441-7). El plásmido transferido puede codificar la proteína no modificada o ligar distintos marcadores de aminoácidos a la proteína diana en la inmunofluorescencia. Los marcadores principales son, p. ej., la proteína fluorescente «green fluorescent protein» (GFP) en sus distintas formas fluorescentes diferenciales y secuencias de péptidos cortas de 6-12 aminoácidos que disponen de anticuerpos altamente afines y específicos. Las células que sintetizan la proteína diana se fijan con paraformaldehído, saponina o metanol. A continuación, en caso de que sea necesario, las células se pueden permeabilizar mediante incubación con detergentes (p. ej., 0,2 % de Triton X-100). Después de la fijación/permeabilización, las células se incuban con un anticuerpo que se dirige contra la proteína diana o contra uno de los marcadores ligados. Después de una etapa de lavado, la fórmula se incuba con un segundo anticuerpo ligado a un marcador fluorescente (p. ej., fluorescina, Texas Red, Dako) que se une a un primer anticuerpo. A continuación, las células marcadas de esta forma se recubren con glicerina y se analizan usando un microscopio de fluorescencia según las indicaciones del fabricante. Así, las emisiones de fluorescencia específicas se obtienen mediante excitaciones específicas, dependiendo de las sustancias empleadas. Normalmente, el análisis permite localizar la proteína diana de forma segura, de manera que, para determinar la calidad del anticuerpo y la proteína diana en tinciones dobles, además de la proteína diana, también se tiñen los marcadores de aminoácidos u otras proteínas marcadoras, cuya localización ya se ha descrito en la bibliografía. La GFP y sus derivados representan una excepción, los cuales se pueden excitar directamente y son fluorescentes por sí mismos, de forma que no es necesario ningún anticuerpo para la detección.

Inmunohistoquímica

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

Se deben usar distintos protocolos en función del anticuerpo individual (p. ej., «Diagnostic Immunohistochemistry, de 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 tejidos específicas sirve para detectar proteínas en el tejido correspondiente. El objetivo de este método es identificar la localización de una proteína en un conjunto de tejidos funcionalmente intacto. La IHC sirve en particular para (1) poder estimar la cantidad de proteína diana en tejidos tumorales y normales, (2) analizar cuántas células sintetizan el gen diana en el tejido tumoral y sano, y (3) definir el tipo de célula en un tejido (tumor, células sanas) en el que se puede detectar la proteína diana. De forma alternativa, las cantidades de proteínas de un gen diana se pueden cuantificar mediante inmunofluorescencia del tejido a través de una cámara digital y un software adecuado (p. ej., Tillvision, Till-photonics, Alemania). Existen frecuentes publicaciones sobre esta tecnología, por ello, se pueden deducir detalles de la tinción y de la microscopia de, p. ej., «Diagnostic Immunohistochemistry», de David J., MD Dabbs ISBN: 0443065667 o «Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron Microscopy" ISBN: 0306467704. Se observa que, debido a las propiedades de los anticuerpos, se deben usar distintos protocolos (a continuación se describe un ejemplo) para llegar a un resultado revelador.

En la IHC se suelen emplear tejidos tumorales definidos histológicamente y tejidos sanos comparables como referencia. En este aspecto, también pueden servir de controles positivos y negativos las líneas celulares en las que se conoce la presencia del gen diana mediante análisis RT-PCR. Siempre se debe realizar un control de fondo complementario.

El tejido fijado (p. ej., fijación con sustancias con contenido de aldehído, formaldehído, paraformaldehído o en soluciones alcohólicas) o fragmentos de tejido ultracongelados con un espesor de 1 a 10 µm se colocan en un soporte de vidrio. Las muestras embebidas en parafina se desparafinan con, p. ej., xileno. Las muestras se lavan con TBS-T y se bloquean en suero. A continuación, tiene lugar la incubación con el primer anticuerpo (disolución: 1:2 a 1:2000) durante 1 a 18 horas, de forma que, por lo general, se usan anticuerpos purificados por afinidad. Después de una etapa de lavado, se efectúa una incubación de aprox. 30 a 60 minutos con un segundo anticuerpo que está ligado a la fosfatasa alcalina (de forma alternativa: p. ej., a la peroxidasa) y que está dirigido contra el primer anticuerpo. A continuación, se efectúa una reacción cromática usando sustratos cromáticos cuya reacción

es causada por las enzimas unidas (cp., p. ej. Shi et al., J. Histochem. Cytochem. 39: 741-748, 1991; Shin et al., Lab. Invest. 64: 693-702, 1991). Para detectar la especificidad del anticuerpo, se puede preparar la competición de la reacción añadiendo previamente el inmunógeno.

Inmunización

(Véase 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 preparación de anticuerpos; los detalles se pueden deducir de las publicaciones citadas. En primer lugar, se inmunizan animales (p. ej., conejos) mediante una primera inyección de la proteína diana deseada. La respuesta inmunitaria del animal al inmunógeno se puede potenciar mediante una segunda o una tercera inmunización dentro de un periodo de tiempo definido (aprox., de 2 a 4 semanas desde la inmunización anterior). De nuevo, en distintos intervalos de tiempo definidos (1.ª obtención de sangre pasadas 4 semanas; a continuación, aprox. cada 2 semanas con, en total, hasta 5 extracciones) se extrajo sangre de los animales y, de ella, se obtuvo un suero inmune.

La inmunización de los animales se efectúa normalmente por medio de uno de cuatro métodos bien establecidos, aunque también se encuentran disponibles otros métodos. Así, la inmunización se puede realizar con péptidos específicos de la proteína diana, con toda la proteína o con secuencias parciales de una proteína que se puede identificar de forma experimental o mediante programas de predicción.

(1) En el primer caso, se sintetizan péptidos conjugados en KLH (keyhole limpet hemocyanin) (longitud: 8-12 aminoácidos) mediante un método in vitro estandarizado y se usan estos péptidos para la inmunización. Por lo general, estas 3 inmunizaciones se efectúan con una concentración de 5 a 1000 µg/inmunización. El desarrollo de la inmunización también se puede efectuar a través de un proveedor de servicios.
(2) De forma alternativa, la inmunización se puede efectuar mediante proteínas recombinantes. Para ello el ADN clonado del gen diana se clona en un vector de expresión y la proteína diana se sintetiza de forma análoga a las condiciones del fabricante en cuestión (p. ej., Roche Diagnostics, Invitrogen, Clontech, Qiagen), p. ej., in vitro sin células, en bacterias (p. ej., en E. coli), en levaduras (p. ej., pombe), en células de insectos o en células de mamíferos. Después de la síntesis en uno de los sistemas, la proteína diana se purifica, de forma que la purificación se efectúa por lo general por medio de métodos cromatográficos estandarizados. Así, para la inmunización también se pueden usar proteínas que disponen de un punto de anclaje molecular como medio de ayuda para la purificación (p. ej., His-Tag, Qiagen; FLAG-Tag, Roche Diagnostics; proteínas de fusión de Gst). Se pueden encontrar varios protocolos en, p. ej., «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience.
(3) En el caso de que se disponga de una línea celular que sintetice la proteína deseada de forma endógena, esta línea celular también se puede usar para preparar el antisuero específico. Así, la inmunización se efectúa en 1 a 3 inyecciones con aprox. 1-5 x 107 células, respectivamente.
(4) La inmunización también se puede efectuar por inyección de ADN (inmunización por ADN). Para ello, en primer lugar, el gen diana se clona en un vector de expresión, de forma que la secuencia diana se encuentra bajo el control de un promotor eucariota fuerte (p. ej., un promotor CMV). A continuación, se transfieren de 5 a 100 µg de ADN como inmunógeno con una «gene gun» en zonas capilares altamente irrigadas de un organismo (p. ej., un ratón o un conejo). El ADN transferido es absorbido por las células del animal, el gen diana se expresa y el animal desarrolla finalmente una respuesta inmunitaria contra el gen diana (Jung et al., Mol Cells 12: 41-49, 2001; Kasinrerk et al., Hybrid Hybridomics 21: 287-293, 2002).

Controles de calidad del suero policlonal o del anticuerpo

Para detectar la especificidad resultan especialmente adecuadas las pruebas basadas en cultivos celulares seguidas de un método Western blot (se describen distintas variaciones en, p. ej., «Current Protocols in Proteinchemistry», John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience). Para la detección se transfiere a las células un ADNc a la proteína diana que está bajo el control de un promotor eucariota fuerte (p. ej., un promotor de citomegalovirus). Para la transfección de ADN en líneas celulares existen varios métodos bien establecidos (p. ej., electroporación, transfección basada en liposomas, precipitación con fosfato de calcio) (p. ej., Lemoine et al. Methods Mol. Biol. 75: 441-7, 1997). De forma alternativa, también se pueden usar líneas celulares que expresen el gen diana de forma endógena (detección mediante RT-PCR específica del gen diana). En un caso ideal, para el control se transfieren también genes homólogos en el experimento para poder detectar la especificidad del anticuerpo analizado en el método Western blot posterior.

En el método Western blot posterior se lisan las células del cultivo celular o de las muestras de tejidos que pueden contener la proteína diana en una solución de SDS al 1 % y se desnaturalizan así las proteínas. Los lisados se separan por electroforesis según su tamaño en geles de poliacrilamida (contenido de SDS del 1 %) desnaturalizados del 8 al 15 % (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, SDS-PAGE). A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana específica (p. ej., nitrocelulosa, Schleicher & Schüll) mediante uno de los varios métodos de transferencia (p. ej., electro transferencia semiseca; Biorad). En esta membrana se puede hacer visible la proteína deseada. Para ello, en primer lugar se incuba la membrana con el anticuerpo que reconoce la proteína diana (dilución de aprox. 1:20 a 1:200, según la especificidad del anticuerpo) durante 60 minutos. Después de una etapa de lavado, la membrana se incuba con un segundo anticuerpo ligado a un marcador (p. ej., una enzima, como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina) que reconoce al primer anticuerpo. A continuación, en una reacción cromática o de quimioluminiscencia se puede hacer visible la proteína diana en la membrana (p. ej., ECL, Amersham Bioscience). En un caso ideal, un anticuerpo con una especificidad alta de la proteína diana debería reconocer por sí mismo solo la proteína deseada.

Se usan distintos métodos para confirmar la localización de la membrana de la proteína diana identificada en el enfoque in silico. Un método importante y bien establecido que usa los anticuerpos descritos anteriormente es el de la inmunofluorescencia (IF). Para ello se usan células de líneas celulares establecidas que, o bien sintetizan la proteína diana (detección de ARN en la RT-PCR o de la proteína en el método Western blot), o bien se les ha transferido ADN de un plásmido antes de la IF. Para la transfección de ADN en líneas celulares existen varios métodos bien establecidos (p. ej., electroporación, transfección basada en liposomas, precipitación con fosfato de calcio) (p. ej., Lemoine et al. Methods Mol. Biol. 75: 441-7, 1997). El plásmido transferido a las células puede codificar la proteína no modificada o ligar distintos marcadores de aminoácidos a la proteína diana en la inmunofluorescencia. Los marcadores más importantes son, p. ej., la proteína fluorescente «green fluorescent protein» (GFP) en sus distintas formas fluorescentes diferenciales, secuencias de péptidos cortas de 6-12 aminoácidos que disponen de anticuerpos altamente afines y específicos o la secuencia corta de aminoácidos Cys-Cys-X-X-Cys-Cys, que se puede unir a sustancias fluorescentes específicas por medio de sus cisteínas (Invitrogen). Las células que sintetizan la proteína diana se fijan con, p. ej., paraformaldehído o metanol. A continuación, en caso de que sea necesario, las células se pueden permeabilizar con detergentes (p. ej., 0,2 % de Triton X-100). A continuación, las células se incuban con un anticuerpo que se dirige contra la proteína diana o contra uno de los marcadores ligados. Después de una etapa de lavado, la fórmula se incuba con un segundo anticuerpo ligado a un marcador fluorescente (p. ej., fluorescina, Texas Red, Dako) que se une al primer anticuerpo. A continuación, las células marcadas de esta forma se recubren con glicerina y se analizan por medio de un microscopio de fluorescencia según las indicaciones del fabricante. Así, las emisiones de fluorescencia específicas se obtienen mediante excitaciones específicas, dependiendo de las sustancias empleadas. Normalmente, el análisis permite la localización segura de la proteína diana, de forma que, para determinar la calidad del anticuerpo y la proteína diana en tinciones dobles, además de la proteína diana, también se tiñen los marcadores de aminoácidos u otras proteínas marcadoras, cuya localización ya se ha descrito en la bibliografía. La GFP y sus derivados representan una excepción, los cuales se pueden excitar directamente y son fluorescentes por sí mismos. La permeabilidad de la membrana, que se puede controlar utilizando detergentes, permite detectar en la inmunofluorescencia si un epítopo inmunógeno se encuentra localizado dentro o fuera de la célula. De esta forma se puede fundamentar experimentalmente la predicción de las proteínas seleccionadas. De forma alternativa, la detección de los dominios extracelulares se puede efectuar mediante citometría de flujo. Para ello, se fijan células en condiciones no permeabilizantes (p. ej., con PBS/Acida de Na/2% FCS/ 5 mM EDTA) y se analizan en el citómetro de flujo según las indicaciones del fabricante. En este método, solo los epítopos extracelulares pueden ser reconocidos por el anticuerpo que analizar. A diferencia de la inmunofluorescencia, usando, p. ej. yoduro de propidio o azul tripán, se puede diferenciar entre células vivas y muertas y así, evitar resultados falsos positivos.

Purificación por afinidad

La purificación de los sueros policlonales fue efectuada en el caso de los anticuerpos peptídicos completamente o, en el caso de los anticuerpos contra proteínas recombinantes, en parte como un servicio de las empresas contratadas. Para ello, el péptido o la proteína recombinante correspondiente se unió a una matriz de forma covalente en ambos casos, estos se equilibraron después de ligarse a un tampón nativo (PBS: phosphate buffered saline) y, a continuación, se incubaron con suero sin tratar. Después de otra etapa de lavado con PBS, el anticuerpo se eluyó con 100 mM de glicina, pH 2,7, y el eluido se neutralizó en el momento en 2 M de TRIS, pH 8. Después, los anticuerpos purificados de esta forma se pudieron emplear para la detección específica de las proteínas diana, tanto mediante transferencia Western blot como mediante inmunofluorescencia.

Preparación de transfectante GFP

Para la microscopia por inmunofluorescencia de antígenos asociados a un tumor expresados de forma heteróloga se clonó el ORF completo de los antígenos de los vectores pGFP-C1- y pGFP-N3 (Clontech). Se transfirieron las construcciones de plásmidos correspondientes a las células CHO y NIH3T3 cultivadas en portaobjetos utilizando el reactivo de transfección Fugene (Roche) según las indicaciones del fabricante y se analizó después de 12 a 24 h a través de una microscopia por inmunofluorescencia.

Citometría de flujo

Se efectuaron mediciones por citometría de flujo según los métodos conocidos (p. ej., Robinson (editor) Handbook of flow cytometry methods. Wiley-Liss, New York, 1993).

Ejemplo 1: Identificación de variantes de corte y empalme de la claudina 18A1 y de la claudina 18A2 como dianas de cáncer diagnósticas y terapéuticas

El gen de la claudina 18 codifica una molécula de la superficie de la membrana con 4 zonas hidrófobas. Según los programas de predicción (TMHMM, TMPred) y la topología descrita para muchos otros miembros de esta familia, la claudina 18 cuenta con 4 dominios transmembranarios y, con ello, dos dominios extracelulares, EX1 y EX2, cuya localización extracelular (conformación 1) se representa en la Fig. 2. El dominio D3, que se localiza entre los dos epítopos extracelulares, se ha descrito como intracelular en la bibliografía relativa a la claudina 18 y a otros miembros de esta familia, y también se predice de esta forma con los programas de predicción convencionales. Tanto el extremo N como el extremo C son intracelulares. Niimi y col. (Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001) describieron dos variantes de corte y empalme de la claudina 18 humana y de ratones que se describieron como expresadas de forma selectiva en el tejido pulmonar (claudina 18A1) o en el tejido gástrico (claudina 18A2). Estas variantes se diferencian en el extremo N.

Según la invención, se analizó hasta qué punto se podían usar las variantes de corte y empalme de la claudina 18A2 (SEQ ID NO: 7) y de la claudina 18A1 (SEQ ID NO: 117) así como sus respectivos productos de traducción (SEQ ID NO: 16 y 118) como marcadores o estructuras diana terapéuticas para los tumores. Se estableció una PCR cuantitativa que puede diferenciar entre las dos variantes seleccionando pares de cebadores específicos de A1 (SEQ ID NO: 109, 110) o específicos de A2 (SEQ ID NO: 107, 108). De forma adicional, la variante de corte y empalme A2 se analizó junto con un segundo par de cebadores en una PCR convencional (SEQ ID NO: 39, 40). Para la variante A1 se describe que solo se activa en tejido pulmonar sano. Sin embargo, en nuestro caso, según la invención hemos concluido de forma sorprendente que la variante A1 también se activa en la mucosa gástrica (Fig. 3). El estómago y el pulmón son los únicos tejidos normales que presentan una activación significativa. Todos los demás tejidos normales son negativos en claudina A1. En el análisis de los tumores se concluyó de forma sorprendente que la claudina A1 está fuertemente activa en una pluralidad de tejidos tumorales. Una expresión especialmente fuerte se da en los tumores de estómago, tumores de pulmón, tumores de esófago (Fig. 3), tumores de cabeza y cuello y los tumores de próstata. Los niveles de expresión de la claudina A1 en los tumores de cabeza y cuello, de próstata, de páncreas y de esófago son de 100 a 10000 veces más altos que los niveles en los tejidos normales correspondientes. Para el análisis de la variante de corte y empalme de la claudina A2 se utilizaron oligonucleótidos que hacían posible específicamente la amplificación de esta transcripción (SEQ ID NO: 39, 40 o 107, 108). La investigación concluyó que la variante de corte y empalme A2 no se expresa en ninguno de los más de 20 tejidos normales analizados, excepto en la mucosa gástrica y, en menor medida, también en el tejido testicular (Fig. 4). Concluimos que, al igual que la variante A1, la variante A2 también está activada en muchos tumores (Fig. 4). Entre ellos se incluyen los tumores de estómago, tumores de páncreas, tumores de esófago y tumores de hígado. Si bien no se puede detectar ninguna activación de la claudina 18A2 en el pulmón sano, se concluyó sorprendentemente que una parte de los tumores de pulmón expresaban la variante de corte y empalme A2.

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

Tejido normal	**Expresión**
Cerebro	-
Cerebelo	-
Miocardio	-
Músculo esquelético	-
Endometrio	-
Estómago	+++
Colon	-
Páncreas	-
Riñón	-
Hígado	-
Testículo (teste)	+
Timo	-
Mama	-
Ovario	-
Útero	-
Piel	-
Pulmón	-
Glándula tiroides	-
Ganglio linfático	-
Bazo	-
PBMC	-
Esófago	-
Tipo de tumor	**Expresión**
Colon	-
Páncreas	++
Esófago	++
Estómago	+++
Pulmón	++
Mama	-
Ovario	-
Endometrio	n. a.
CCC	++
Riñón	-
Próstata	-

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

Tejido normal	**Expresión**
Cerebro	-
Cerebelo	-
Miocardio	-
Músculo	-
Endometrio	-
Estómago	+++
Colon	-
Páncreas	-
Riñón	-
Hígado	-
Testículo	+
Timo	-
Mama	-
Ovario	-
Útero	-
Piel	-
Pulmón	+++
Glándula tiroides	-
Ganglio linfático	-
Bazo	-
PBMC	-
Esófago	-
Tipo de tumor	**Expresión**
Colon	-
Páncreas	++
Esófago	++
Estómago	+++
Pulmón	++
Mama	+
Ovario	n. a.
Endometrio	n. a.
CCC	++
Riñón	-
Próstata	++

La PCR convencional como análisis de control independiente también confirmó los resultados de la PCR cuantitativa. Para ello se utilizaron oligonucleótidos (SEQ ID NO: 39, 40) que permiten una amplificación específica de la variante de corte y empalme A2. Según la invención, se mostró que la mayoría de los tumores gástricos y la mitad de los tumores de páncreas analizados presentan una fuerte expresión de estas variantes de corte y empalme (Fig. 1). Por el contrario, no se puede detectar una expresión en otros tejidos con la PCR convencional. Particularmente, no se encuentra ninguna expresión en los tejidos normales importantes, como pulmón, hígado, sangre, ganglios linfáticos, mama y riñón (Tabla 1). En este aspecto, las variantes de corte y empalme representan, según la invención, marcadores moleculares altamente específicos de tumores del tracto gastrointestinal superior, así como tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, tumores de próstata y sus metástasis. Estos marcadores moleculares se pueden usar según la invención para detectar células tumorales. La detección de los

tumores se puede efectuar, según la invención, con los oligonucleótidos nombrados (SEQ ID NO: 39, 40, 107-110). Como oligonucleótidos son particularmente adecuados los pares de cebadores de los que al menos uno se une en condiciones restrictivas a una sección de 180 pares de bases de largo de la transcripción que es específica de un (SEQ ID NO: 8) o de otra variante de corte y empalme (SEQ ID NO: 119).

Estos productos génicos son estructuras diana atractivas desde un punto de vista terapéutico, puesto que su ausencia en la mayoría de los órganos relevantes para la toxicidad hace que no se espere ningún efecto adverso, mientras que la fuerte activación en las células de los tipos de cáncer nombrados hace que se espere una buena unión a estos y medie en los efectos que dañan las células correspondientes.

Para comprobar estos datos a nivel proteínico se generaron anticuerpos específicos de la claudina o sueros inmunes inmunizando animales.

El dominio EX1 extracelular N-terminal se diferencia en la secuencia en las dos variantes de corte y empalme, A1 y A2 (SEQ ID NO: 111 de A1 y SEQ ID NO: 112 de A2). El dominio EX2 extracelular C-terminal es idéntico en las dos variantes (SEQ ID NO: 137). Hasta el momento, todavía no se ha descrito ningún anticuerpo que se una a los dominios extracelulares de la claudina 18. Hasta el momento, tampoco se ha descrito ningún anticuerpo que pueda diferenciar de forma específica entre las variantes A1 y A2. Según la invención para la inmunización para generar anticuerpos se seleccionaron epítopos peptídicos y fragmentos de proteínas situados de forma extracelular que son específicos de la variante A1 o A2, o se encuentran en las dos variantes. Para la inmunización se seleccionaron los siguientes péptidos, entre otros, para preparar anticuerpos:

SEQ ID NO: 17: DQWSTQDLYN (dominio extracelular N-terminal, específico de A2, unión independientemente de la glucosilación)
SEQ ID NO: 18: NNPVTAVFNYQ (dominio extracelular N-terminal, específico de A2, unión principalmente a la forma no glucosilada, N37)
SEQ ID NO: 113: STQDLYNNPVTAVF (dominio extracelular N-terminal, específico de A2, unión solo a la forma no glucosilada, N37)
SEQ ID NO: 114: DMWSTQDLYDNP (dominio extracelular N-terminal, específico de A1)
SEQ ID NO: 115: CRPYFTILGLPA (dominio extracelular N-terminal, principalmente específico de A1)
SEQ ID NO: 116: TNFWMSTANMYTG (dominio extracelular C-terminal, reconoce tanto a A1 como a A2).

En nuestro caso, pudimos generar anticuerpos, entre otros, que reconocían el dominio N-terminal de la variante de corte y empalme de la claudina 18-A1 de forma selectiva, pero no la variante A2 (Fig. 8). Usando epítopos para inmunizaciones que se encontraban en el dominio extracelular C-terminal idéntico en las dos variantes de corte y empalme pudimos preparar anticuerpos que reconocían ambas variantes (Fig. 7).

Se representan, a modo de ejemplo, los datos de un anticuerpo específico de A2 que se preparó mediante inmunización con la SEQ ID NO: 17. El anticuerpo específico se puede usar para los análisis por inmunofluorescencia en distintas condiciones de fijación. En tinciones comparativas de líneas celulares positivas así como negativas en RT-PCR, la proteína correspondiente se puede detectar de forma específica en, entre otros, las líneas celulares del tumor gástrico, tumor esofágico y tumor pancreático tipificadas como positivas en una cantidad fácilmente detectable (Fig. 5). La proteína endógena se localiza en la membrana y forma agregados focales mayores en la membrana (Fig. 5). Con este anticuerpo se desarrollaron tinciones inmunohistoquímicas en tejidos humanos. Confirmamos la distribución de tejido selectiva de esta proteína. Se analizó una amplia gama de distintos tejidos normales de los que, en casi todos, no se pudo detectar la proteína de la claudina 18A2, como se representó, por ejemplo, para el hígado, el pulmón, el riñón y el colon. Solo encontramos una activación de esta proteína en el tejido gástrico normal (Fig. 12). En nuestro caso, vimos sorprendentemente que la variante A2 de la claudina 18 se puede detectar en las células diferenciadas de la mucosa gástrica, pero no en las células madre. Las células diferenciadas de la mucosa gástrica se someten a una renovación constante. Todo el epitelio gástrico se sustituye continuamente de forma fisiológica partiendo de las células madre del estómago. Ello apoya la utilidad de la variante A2 como estructura diana terapéutica, puesto que, en nuestro caso, mostramos, según la invención, que las células madre del estómago como la población celular indispensable de la mucosa gástrica, así como todos los demás órganos sanos no soportan la variante A2 y, con ello, no pueden ser atacados por una sustancia dirigida específicamente contra la variante A2. En una serie de tumores humanos detectamos, a través del anticuerpo, la variante A2 de la claudina 18 (Fig. 13) que ya habíamos apreciado en los análisis de RT-PCR, particularmente, en tumores de estómago, esófago y pulmón. Según la invención, estos tumores se pueden abordar terapéuticamente.

Por otra parte, el anticuerpo descrito anteriormente se empleó para una detección de proteínas en el método Western blot. Según las expectativas, la proteína solo se detecta en el estómago y en ningún otro tejido normal,

tampoco en el pulmón, donde solo está activada la variante A1 (Fig. 9). En la tinción comparativa de los tumores de estómago y del tejido normal gástrico adyacente de los pacientes se detectó sorprendentemente que esta proteína tiene un peso de masa más reducido en todos los tumores de estómago en los que se detectó la claudina 18A2 (Fig. 10, izquierda). En una serie de experimentos se concluyó, según la invención, que una banda de estas dimensiones se produce tratando el lisado del tejido normal gástrico con el agente desglucosilante PNGase F (Fig. 10, derecha). Mientras que en todos los tejidos normales solo se puede detectar la forma glucosilada de la variante A2, la A2 como tal se puede detectar en más del 60 % de los tumores de estómago analizados, en concreto, solo en la forma desglucosilada. A pesar de que la variante A2 de la claudina 18 tampoco se detecta a nivel proteínico en el pulmón normal, también se puede encontrar ya en la RT-PCR cuantitativa en los tumores de pulmón. En este caso, también se encuentra solo la variante desglucosilada (Fig. 11).

La claudina 18 es por sí misma un antígeno de diferenciación altamente selectivo del estómago (variante A2) o del pulmón y del estómago (variante A1). Nuestros datos indican que se ve claramente afectado por modificaciones de la maquinaria de glucosilación asociadas al tumor y en los tumores surge un tipo especial de la variante A2 que está desglucosilado. Los resultados del tratamiento con PNGaseF muestran que la claudina 18A2 se diferencia en el tejido tumoral y normal respecto a su N-glucosilación.

La glucosilación de un epítopo puede evitar la unión de un anticuerpo específico de este epítopo y, en el presente caso, contribuir a que un anticuerpo de este tipo no se pueda unir a la claudina 18A2 en los tejidos normales, sino exclusivamente en la forma no glucosilada de las células cancerosas. Para preparar anticuerpos según la invención que se unan de forma exclusiva a los epítopos no glucosilados, se tuvo esto en cuenta en la selección de los inmunógenos. Según la invención, seleccionamos distintas regiones de la claudina 18A2 que pueden estar presentes de forma distintamente glucosilada en el tejido tumoral y el tejido normal. Identificamos las regiones que comprenden los aminoácidos 37, 38, 45, 116, 141, 146 y 205 de la claudina 18A2, entre otros, como puntos potenciales de glucosilación de la claudina 18A2 (Fig. 2, abajo). Las células tumorales y el tejido normal se diferencian por una glucosilación distinta en una o varias de estas posiciones. La mayoría de estas zonas no representan ningún punto de glucosilación clásico, pero incluyen asparagina, serina y treonina, que en casos aislados se pueden glucosilar (predicción, Fig. 2, abajo). Según la invención, las dos variantes de la claudina 18 tienen un único motivo de glucosilación clásico en el dominio D3, que se considera intracelular en la bibliografía y en los algoritmos de predicción actuales correspondientes. No obstante, en una tetraspanina con una estructura similar a la claudina 18, la PMP 22, se mostró que los dominios de membrana hidrófobos 2 y 3 de la PMP 22 no recorren la membrana celular de forma completa, sino que solo se intercalan de forma parcial en la membrana plasmática (Taylor et al., J Neurosc. Res. 62:15-27, 2000). Por este motivo, en el caso de la PMP22, toda la zona entre los dos dominios transmembranarios exteriores se localiza de forma extracelular.

Hipotetizamos y analizamos la posibilidad de una topología de este tipo para la claudina 18A2. Para ello, preparamos 3 construcciones que contenían una secuencia marcadora (identificador His o HA) en uno de los dominios EX1, EX2 o D3 respectivamente (Fig. 15, arriba). Estas se transfirieron a líneas celulares y se analizaron para determinar si un anticuerpo dirigido contra estas secuencias de marcador se unía a células no permeabilizadas, lo que requiere que la zona correspondiente de la proteína sea extracelular desde un punto de vista topológico. Puesto que las tres zonas de la molécula fueron medidas como extracelulares por la citometría de flujo (Fig. 15, abajo), pudimos comprobar que la claudina 18A2 puede encontrarse en una conformación con dos dominios transmembranarios y un dominio grande situado de forma extracelular (Fig. 2, conformación 2). Esta conformación es relevante desde un punto de vista bioquímico y terapéutico, puesto que contiene puntos de unión adicionales para anticuerpos terapéuticos (SEQ ID NO: 142, 143).

Según la invención, se pueden preparar, preferentemente, anticuerpos que diferencian entre variantes glucosiladas y no glucosiladas de la claudina 18A2. Estos son especialmente específicos de las células tumorales. En la preparación de anticuerpos específicos de glucosilación, junto con los dominios de glucosilación, también tuvimos en cuenta estas opciones distintas de conformación.

Preferentemente, aunque no de forma excluyente, los fragmentos proteínicos de la zona D3 de la claudina 18A2 son adecuados para la inmunización de animales. Ello se ha representado, por ejemplo, para dos anticuerpos con mAB1 y mAB2 (Fig. 17). Analizamos las propiedades de unión de estos anticuerpos a líneas celulares que expresan, o bien la variante A1, o bien la A2 de la claudina 18. Pudimos mostrar que la claudina 18A2 es accesible para los anticuerpos de la superficie celular. Según la invención, los anticuerpos de este tipo son específicos de la variante A2 y no se unen a la variante A1 (Fig. 17). Introdujimos secuencias exógenas cortas (myc-tag) en las zonas de los dominios extracelulares Ex1 y Ex2, respectivamente (Fig. 43). En el ejemplo de mAB1 se representa que las propiedades de unión del anticuerpo no se ven afectadas por lo mismo y que el verdadero epítopo se

encuentra en el dominio D3. Los anticuerpos generados se pueden usar para fines diagnósticos así como terapéuticos. Los sueros inmunes, como el descrito en el presente documento (contra el péptido de SEQ ID NO: 17) pueden usarse, p. ej., en el método Western blot con fines diagnósticos. Según la invención, mediante la inmunización con péptidos que contienen al menos una de estas regiones (p. ej., péptido de la SEQ ID NO: 113 (Figura 6), péptido de la SEQ ID NO: 142-145) se pueden preparar anticuerpos que no se pueden unir al epítopo glucosilado. Según la invención, los anticuerpos de este tipo se unen de forma específica a los epítopos desglucosilados en las células tumorales. La falta de glucosilación en comparación con los tejidos normales en una de las posiciones nombradas también podría estar causada por una desglucosilación endógena secundaria en las células tumorales. Una desglucosilación de este tipo está asociada a una transformación Asn (N)→ Asp (D) del aminoácido en cuestión. Por ello, para la preparación de anticuerpos contra las variantes asociadas a tumores modificadas de esta forma se pueden usar péptidos derivados de la claudina 18A2 según la invención, en los que se sustituye el aminoácido Asn (N), en al menos una de las posiciones 37, 38, 45, 116, 141, 146 y 205 del péptido de la claudina 18A2, por un Asp (D) (p. ej., SEQ ID NO: 146-150). Se pueden emplear particularmente los anticuerpos de este tipo, puesto que son altamente selectivos de las células tumorales. Los anticuerpos preparados también se pueden usar directamente para preparar anticuerpos recombinantes quiméricos o humanizados. Ello también se puede efectuar directamente con anticuerpos obtenidos directamente de conejos (véase al respecto J Biol Chem. 2000 May 5;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 conservaron los linfocitos de los animales inmunizados. También para métodos inmunoterapéuticos, como vacunas o la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de antígenos, los aminoácidos 1-47 (SEQ ID NO: 19 y 120) representan ser epítopos especialmente buenos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

<120> Productos génicos expresados de forma diferencial en tumores y su uso

<130> 342-23 EPT5
EP

<150> DE 10 2004 024 617.3
<151> 2004-05-18

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 7
<211> 786
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7

atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtggttt cactgattgg gattgcgggc 60

atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtacaa caaccccgta 120

acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180

accgagtgcc ggggctactt caccctgctg gggctgccag ccatgctgca ggcagtgcga 240

gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcctggtatc catctttgcc 300

ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc 360

tccgggatca tgttcattgt ctcaggtctt tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420

aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg 480

atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca tttggtgcgg ctctgttcgt gggctgggtc 540

gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tcgcctgccg gggcctggca 600

ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct caggccacag tgttgcctac 660

aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc tttgggtcca acaccaaaaa caagaagata 720

tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttccaa gcacgactat 780

gtgtaa 786

<210> 8
<211> 180
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8

tgcgccacca tggccgtgac tgcctgtcag ggcttggggt tcgtggtttc actgattggg 60

attgcgggca tcattgctgc cacctgcatg gaccagtgga gcacccaaga cttgtacaac 120

aaccccgtaa cagctgtttt caactaccag gggctgtggc gctcctgtgt ccgagagagc 180

<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

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
```

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

<400> 17

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn
1 5 10

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

<400> 18

Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln
1 5 10

<210> 19
<211> 47
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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
35 40 45

<210> 39
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<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

cggctttgta gttggtttct tctggtg 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 tcaggcttca ccga 24

<210> 110
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 110

tgttggcttt ggcagagtcc 20

<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

Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
50 55

<210> 112
<211> 53
<212> PRT
<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

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

<400> 113

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
1 5 10

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

<400> 114

Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro
1 5 10

<210> 115
<211> 12
<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

ctggccggct gcatcgcggc caccgggatg gacatgtgga gcacccagga cctgtacgac 120

aaccccgtca cctccgtgtt ccagtacgaa gggctctgga ggagctgcgt gaggcagagt 180

tcaggcttca ccgaatgcag gccctatttc accatcctgg gacttccagc catgctgcag 240

gcagtgcgag ccctgatgat cgtaggcatc gtcctgggtg ccattggcct cctggtatcc 300

atctttgccc tgaaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgccaa agccaacatg 360

acactgacct ccgggatcat gttcattgtc tcaggtcttt gtgcaattgc tggagtgtct 420

gtgtttgcca acatgctggt gactaacttc tggatgtcca cagctaacat gtacaccggc 480

atgggtggga tggtgcagac tgttcagacc aggtacacat ttggtgcggc tctgttcgtg 540

ggctgggtcg ctggaggcct cacactaatt gggggtgtga tgatgtgcat cgcctgccgg 600

ggcctggcac cagaagaaac caactacaaa gccgtttctt atcatgcctc aggccacagt 660

gttgcctaca 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

<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

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

<400> 119

gccaggatca tgtccaccac cacatgccaa gtggtggcgt tcctcctgtc catcctgggg 60

ctggccggct gcatcgcggc caccgggatg gacatgtgga gcacccagga cctgtacgac 120

aaccccgtca cctccgtgtt ccagtacgaa gggctctgga ggagctgcgt gaggcagagt 180

tcaggcttca ccgaatgcag gccctatttc accatcctgg gacttcc 227

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

<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

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

<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

<210> 142
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 142

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
1 5 10 15

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
20 25 30

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
35 40 45

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
50 55 60

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
65 70 75 80

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
85 90 95

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
100 105 110

Cys Ile Ala Cys
115

<210> 143
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 143

Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr
1 5 10 15

Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
20

<210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 144

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr
1 5

<210> 145
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 145

Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
1 5 10

<210> 146
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146

Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asp Met Thr Leu Thr Ser Gly
1 5 10

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 147

Ser Ala Lys Ala Asp Met Thr Leu Thr
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148

Ala Lys Ala Asp Met Thr Leu Thr Leu
1 5

<210> 149
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 149

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp 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

<210> 150
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une a una proteína o a un polipéptido, en donde la proteína o el polipéptido son codificados por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 7 u 8, en donde el anticuerpo se une a un punto de unión dentro de la SEQ ID NO: 142 o 143, para su uso en un método diagnóstico o terapéutico.

2. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

3. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo que se une de forma selectiva a la proteína o al polipéptido.

4. Anticuerpo para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo se acopla a un medio terapéutico o diagnóstico.

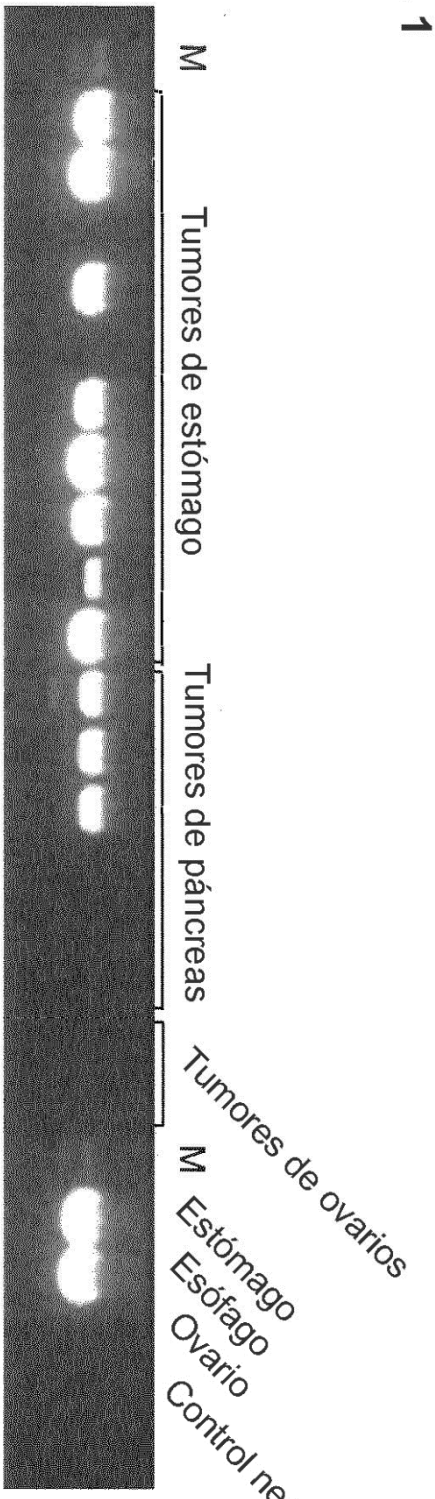
5. Composición farmacéutica para su uso en un método terapéutico, en donde la composición comprende un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 4.

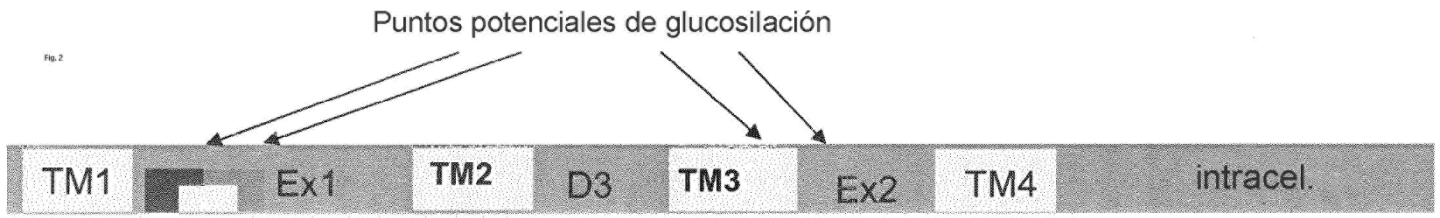
6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5 para tratar una enfermedad de cáncer que se distingue por la expresión de un antígeno asociado a un tumor.

7. Anticuerpo según la reivindicación 4 para su uso en un método para tratar, diagnosticar o controlar una enfermedad de cáncer que se distingue por la expresión de un antígeno asociado a un tumor, en donde el método comprende administrar el anticuerpo y el antígeno asociado a un tumor tiene una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico según la SEQ ID NO: 7 u 8.

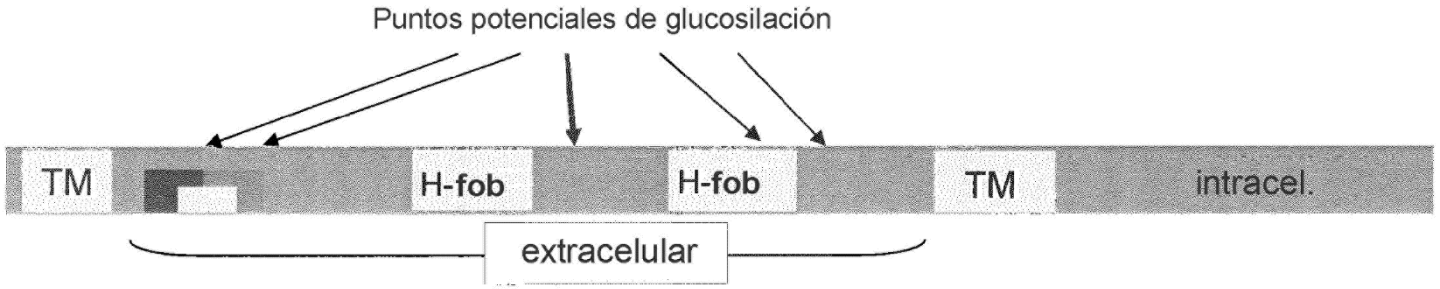
8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6 o anticuerpo para su uso según la reivindicación 7, en donde la enfermedad es un tumor pulmonar, un tumor esofágico o un tumor pancreático.

Fig. 1


M
Tumores de estómago
Tumores de páncreas
Tumores de ovarios
M
Estómago
Esófago
Ovario
Control negativo



Conformación 1



Conformación 2

Puntos de glucosilación previstos (posiciones de los aminoácidos)
Claudina 18A2

Nombre Sec.	Posición	Rangos de los puntos de glucosilación	Resultado
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)	-

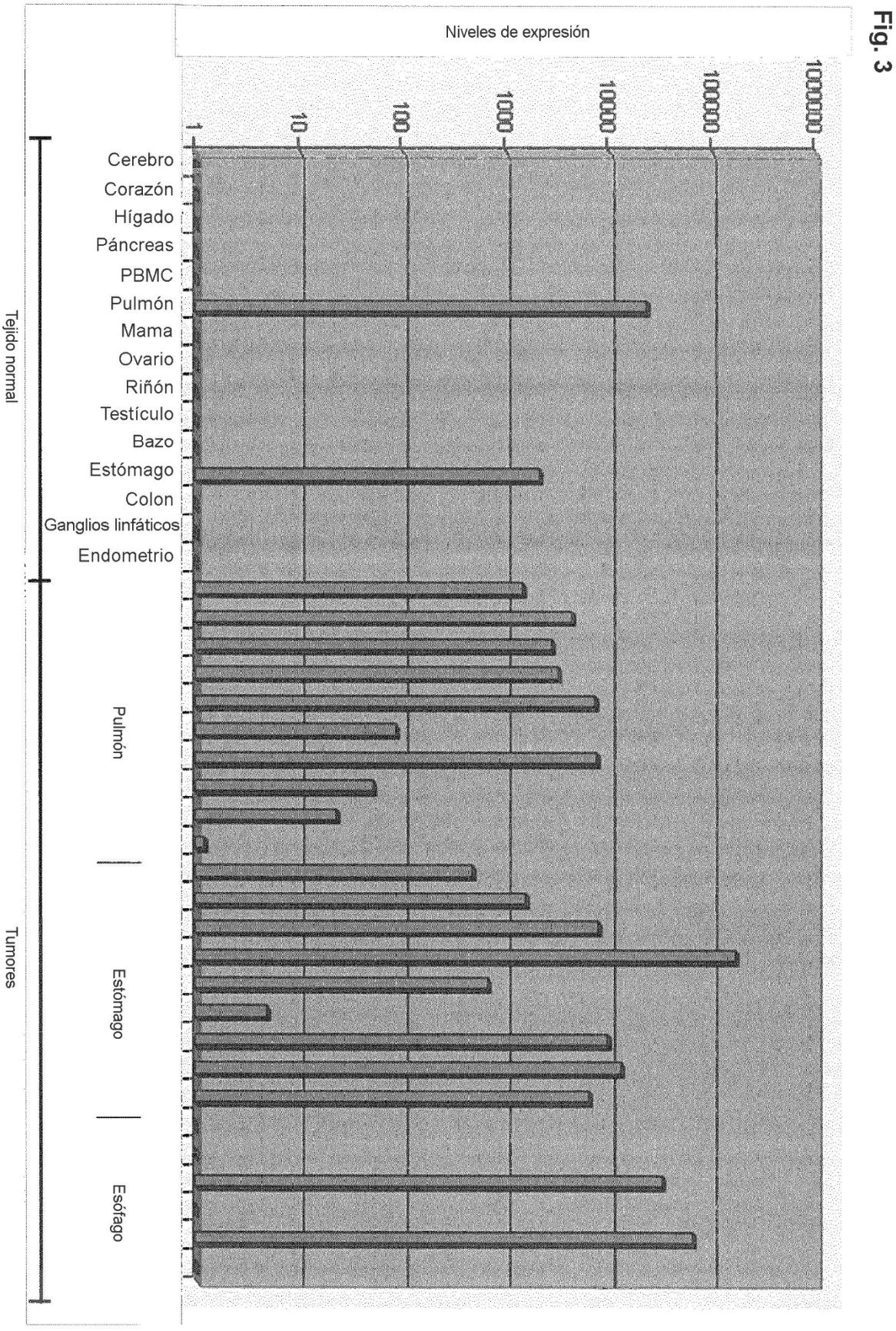

Niveles de expresión
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
Tejido normal
Cerebro
Corazón
Hígado
Páncreas
PBMC
Pulmón
Mama
Ovario
Riñón
Testículo
Bazo
Estómago
Colon
Ganglios linfáticos
Endometrio
Tumores
Pulmón
Estómago
Esófago

Fig. 3

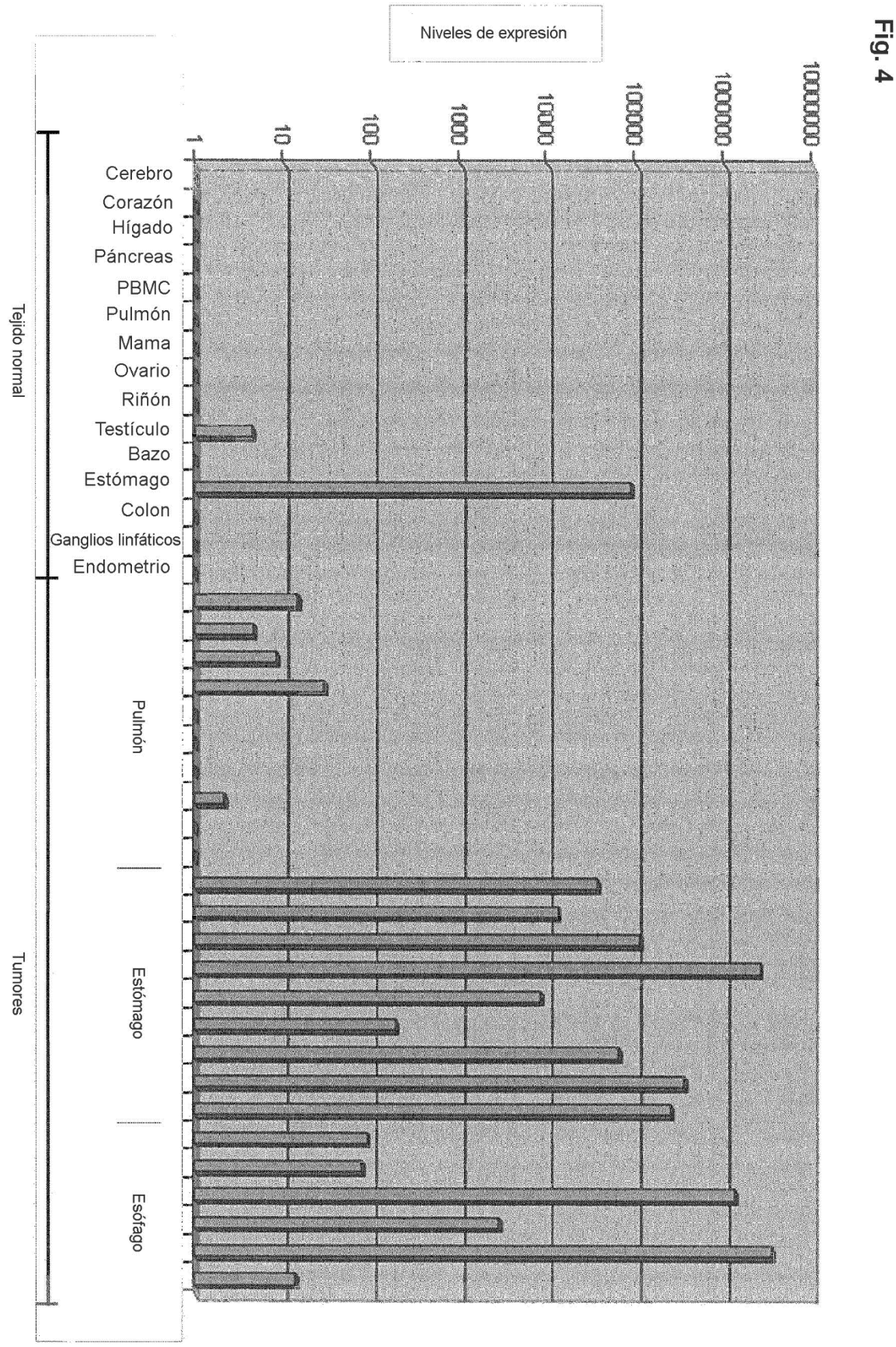

Niveles de expresión
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
Tejido normal
Tumores
Cerebro
Corazón
Hígado
Páncreas
PBMC
Pulmón
Mama
Ovario
Riñón
Testículo
Bazo
Estómago
Colon
Ganglios linfáticos
Endometrio
Pulmón
Estómago
Esófago

Fig. 4

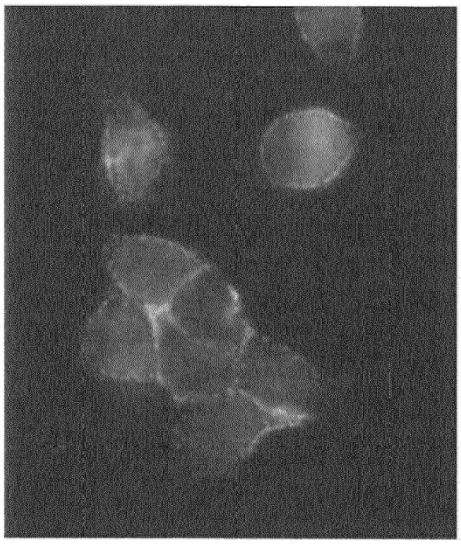


Fig. 5A

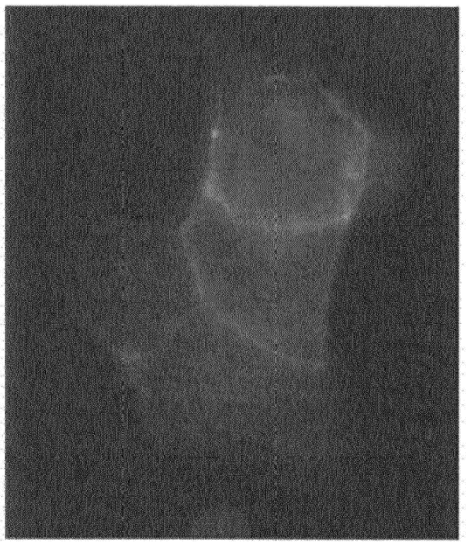


Fig. 5B

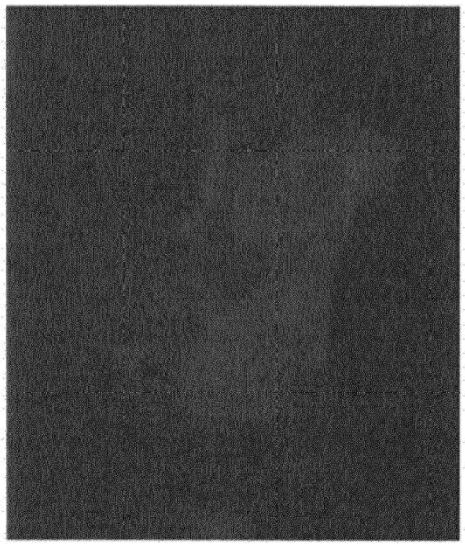


Fig. 5C

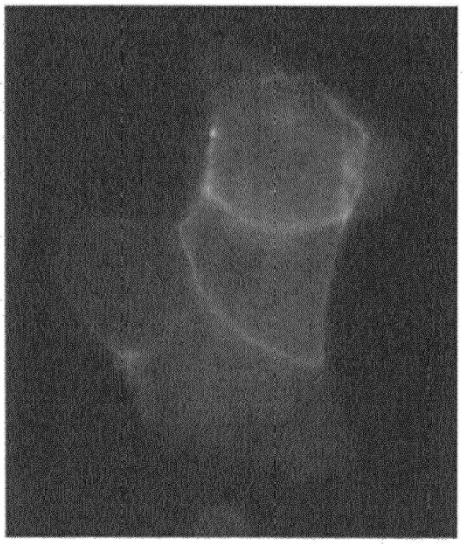


Fig. 5D

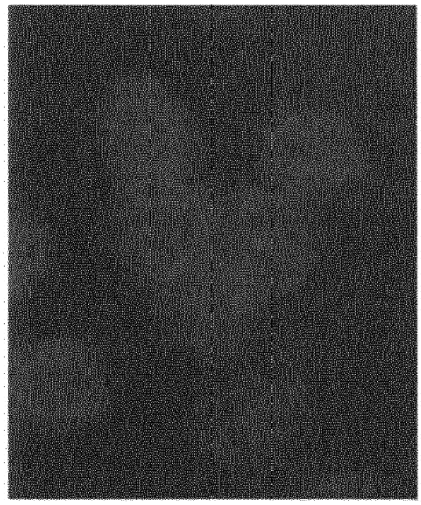


FIG. 6A

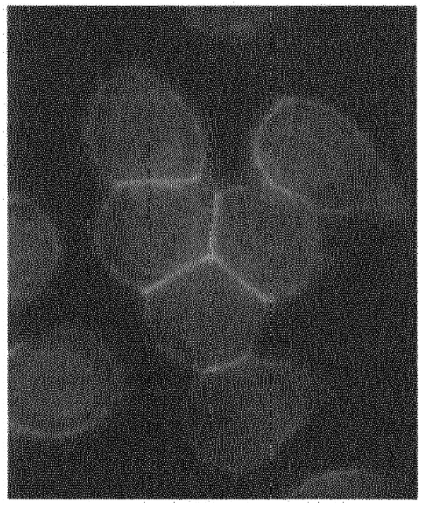


FIG. 6B

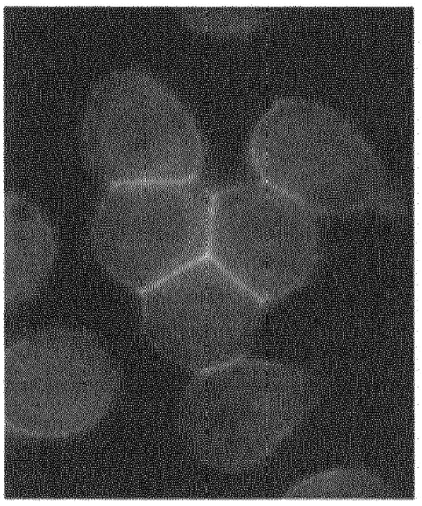
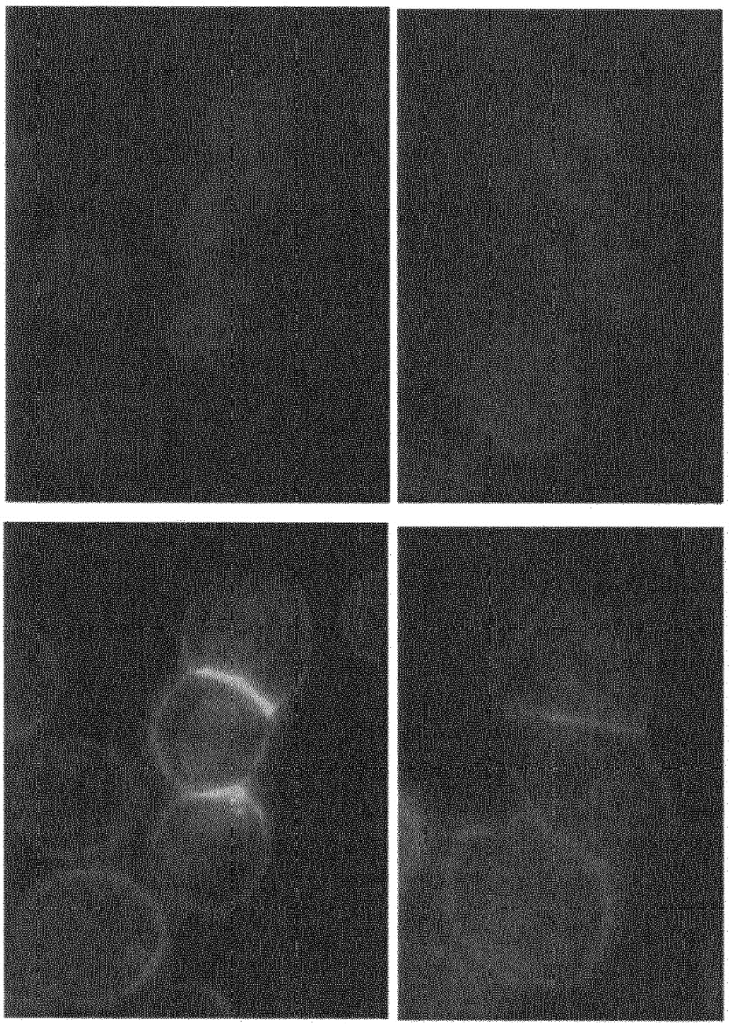


FIG. 6C

Fig. 7



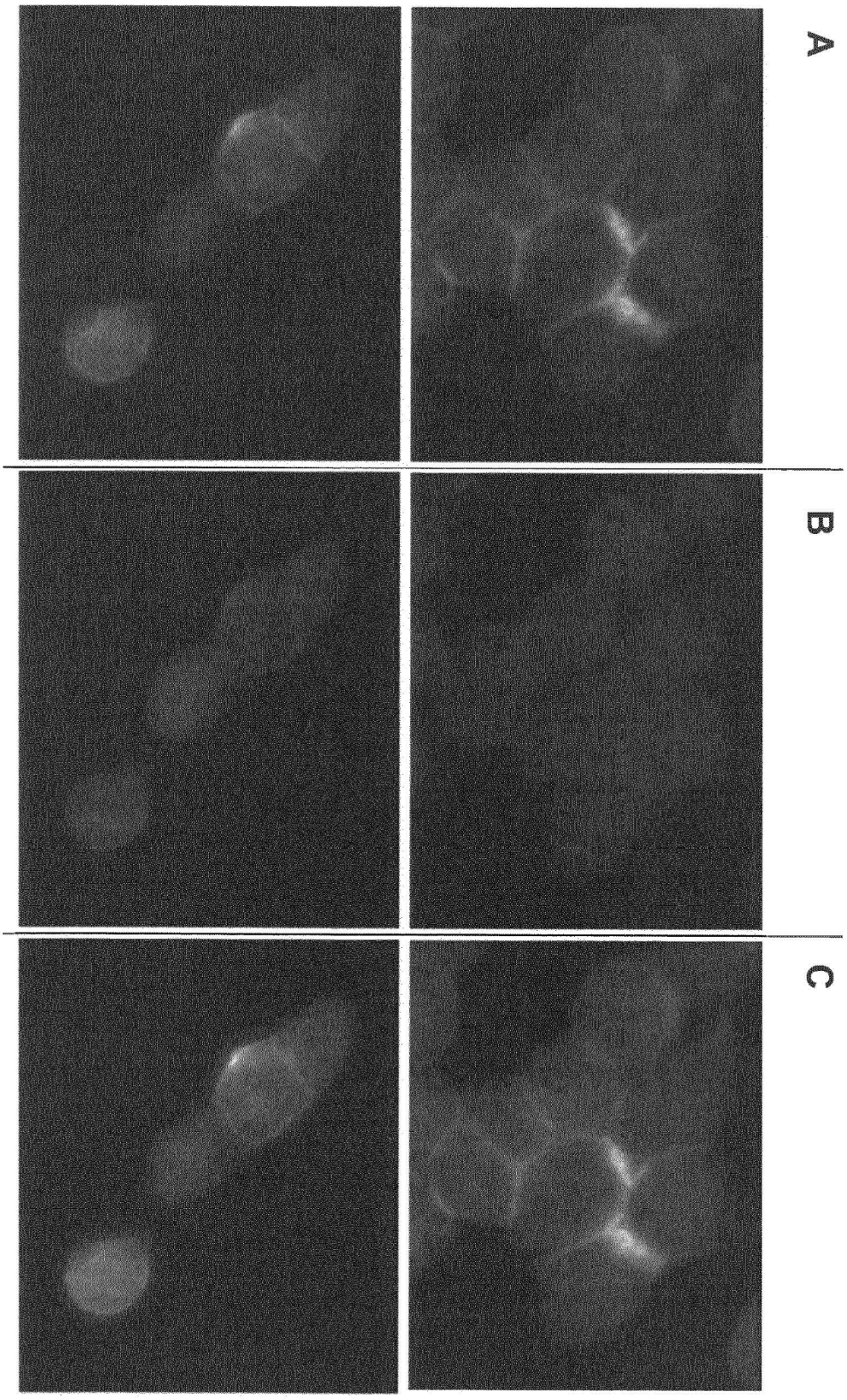


Fig. 8

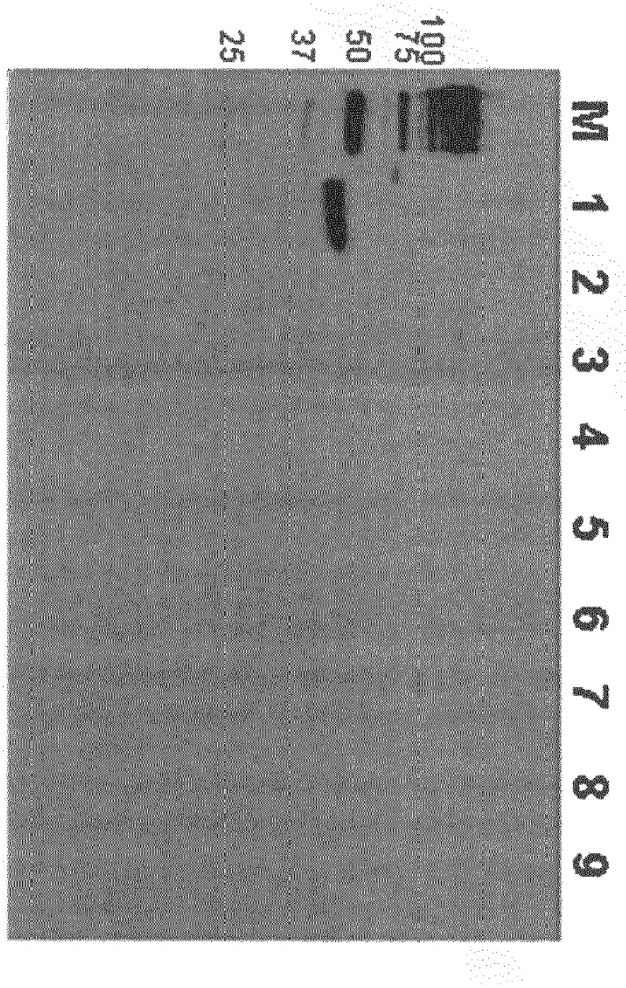


Fig. 9

Fig. 10A

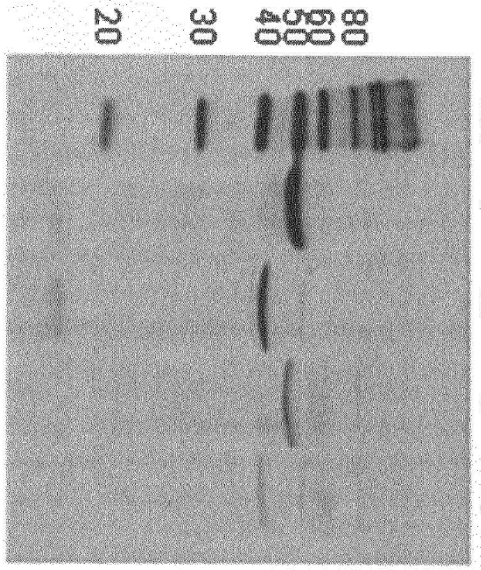


Fig. 10B

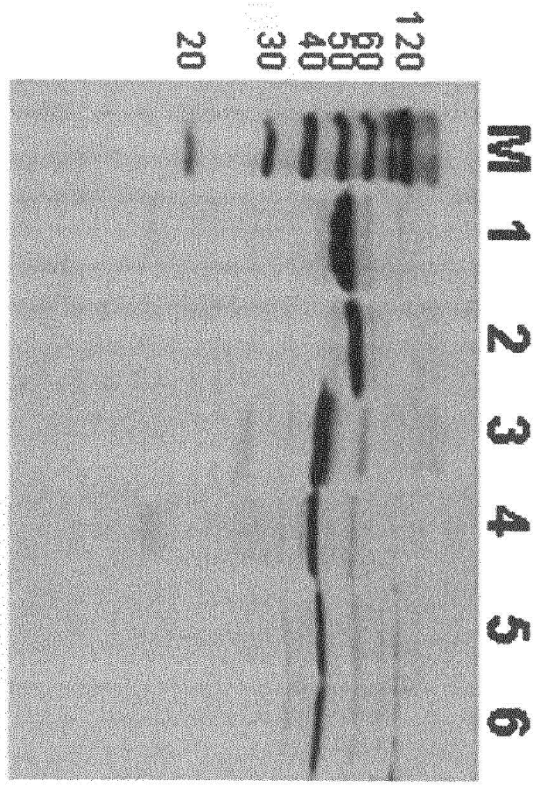


Fig. 10C

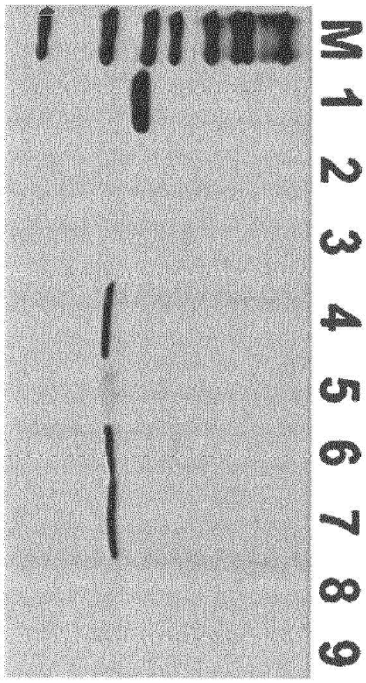


Fig. 10D

Especificidad de tejido de las líneas celulares	Líneas celulares positivas / analizadas
Estómago	4 / 5
Esófago	1 / 3
Pulmón	2 / 5
Páncreas	4 / 5
Mama	1/ 4
Colon	1 / 3
Riñón	0 / 1
Piel	0 / 1
Ovario	1 / 2
Hígado	0 / 1

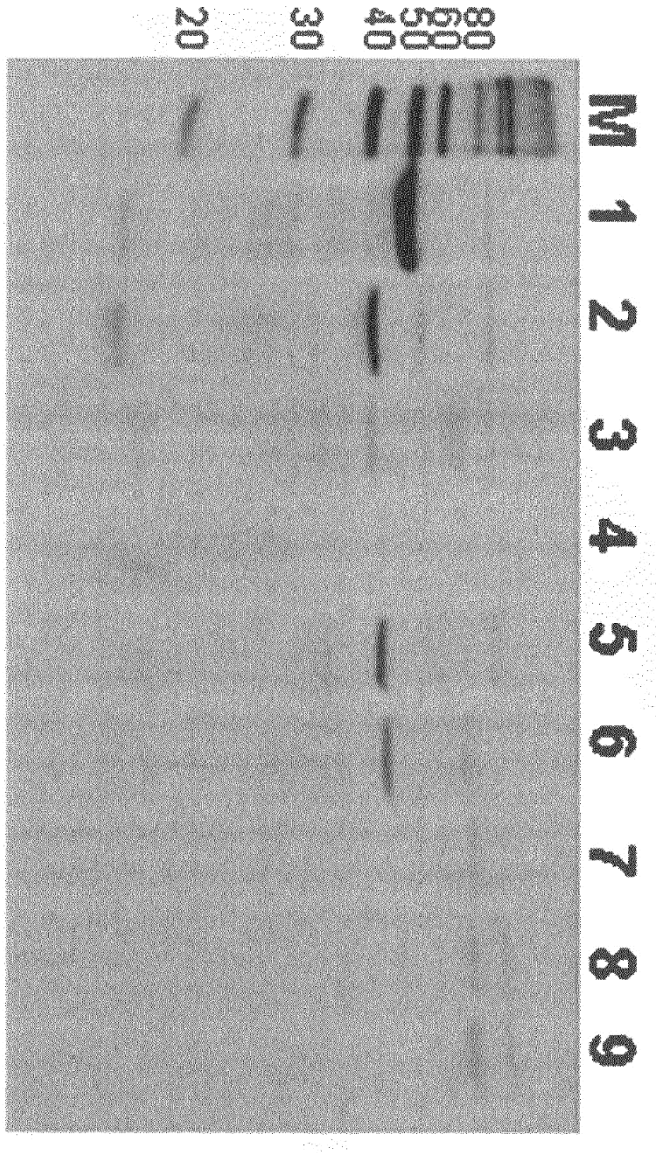


Fig. 11

Fig. 12

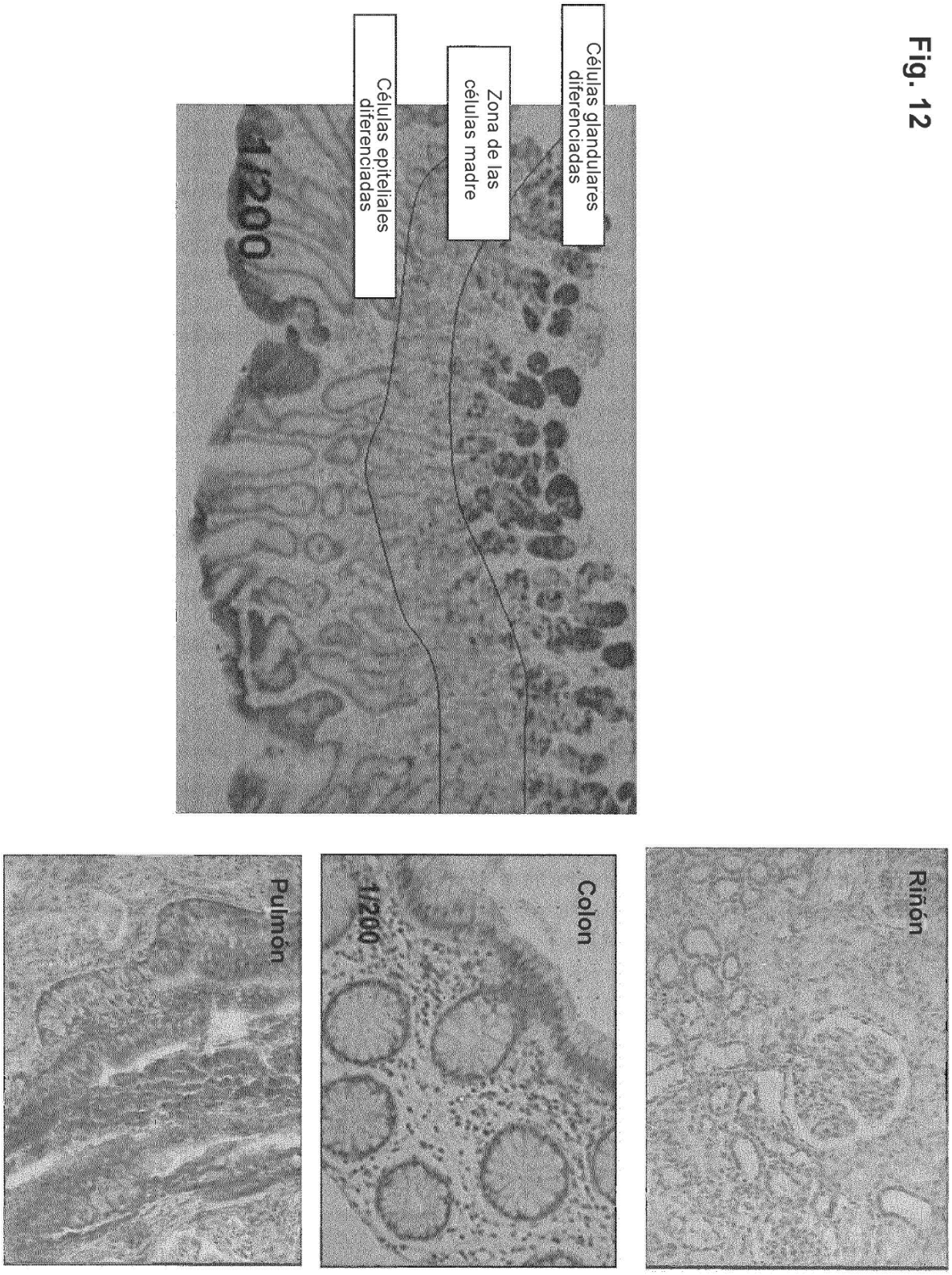

Células glandulares diferenciadas
Zona de las células madre
Células epiteliales diferenciadas
1/200
Riñón
Colon
1/200
Pulmón

Fig. 13A

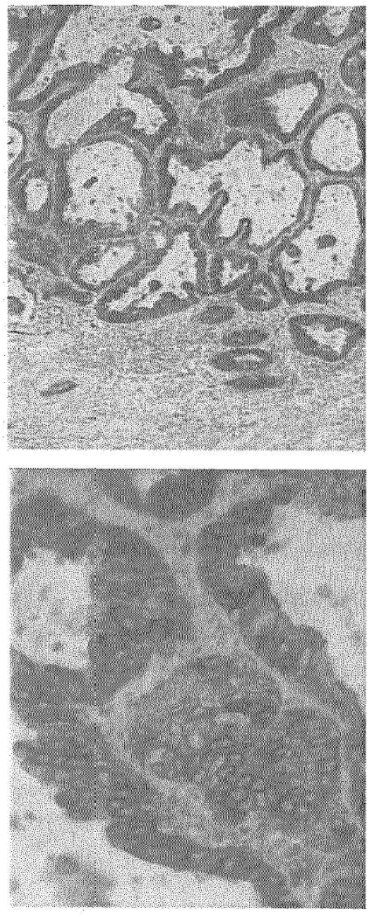


Fig. 13B

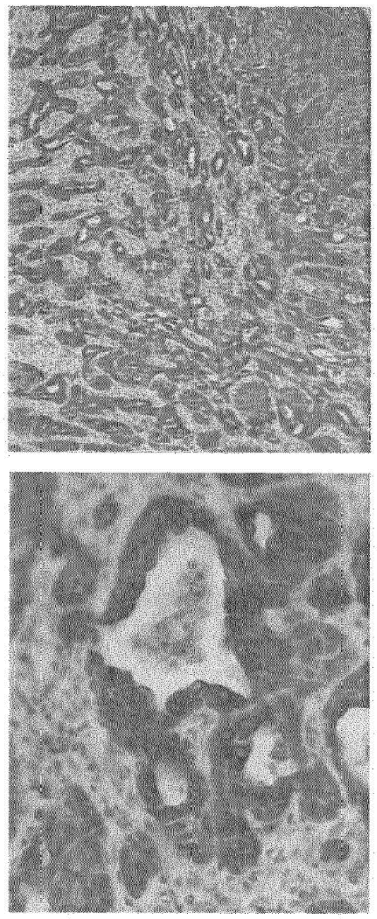


Fig. 13C

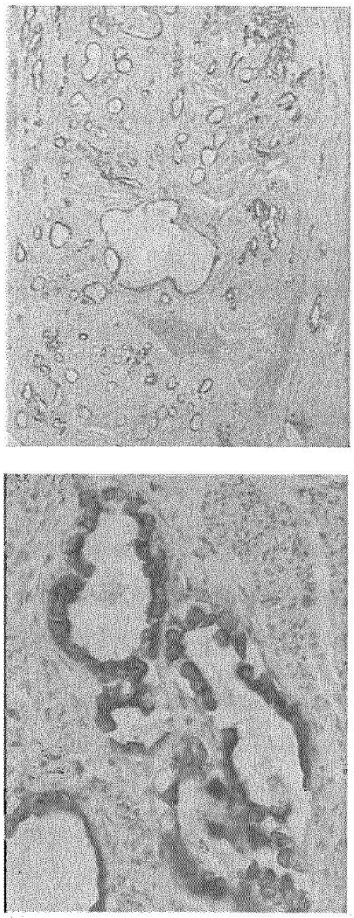


Fig. 13D

Tejido	Tumor	
	Tipo de tumor	Positivo / total
Estómago	AdenoCa	9/10
Pulmón	AdenoCa	11/12
Pulmón	SCC	0/2
Esófago	AdenoCa	5/5
Esófago	SCC	0/3
Próstata		1/3
Mama		1/3
Riñón	RCC	0/3
Colon		0/3
Cerebro	Glioblastoma	0/3

Fig. 14

ID	Secuencia
#7	ATGGCCGTGACTGCCTGTCAGGGCTTGGGGTTCGTGGTTTCACTGATTGGGATTGCGGGCATCATTGCTG CCACCTGCATGGACCAGTGGAGCACCCAAGACTTGTACAACAACCCCGTAACAGCTGTTTTCAACTACCA GGGGCTGTGGCGCTCCTGTGTCCGAGAGAGCTCTGGCTTCACCGAGTGCCGGGGCTACTTCACCCTGCTG GGGCTGCCAGCCATGCTGCAGGCAGTGCGAGCCCTGATGATCGTAGGCATCGTCCTGGGTGCCATTGGCC TCCTGGTATCCATCTTTGCCCTGAAATGCATCCGCATTGGCAGCATGGAGGACTCTGCCAAAGCCAACAT GACACTGACCTCCGGGATCATGTTCATTGTCTCAGGTCTTTGTGCAATTGCTGGAGTGTCTGTGTTTGCC AACATGCTGGTGACTAACTTCTGGATGTCCACAGCTAACATGTACACCGGCATGGGTGGGATGGTGCAGA CTGTTCAGACCAGGTACACATTTGGTGCGGCTCTGTTCGTGGGCTGGGTCGCTGGAGGCCTCACACTAAT TGGGGGTGTGATGATGTGCATCGCCTGCCGGGGCCTGGCACCAGAAGAAACCAACTACAAAGCCGTTTCT TATCATGCCTCAGGCCACAGTGTTGCCTACAAGCCTGGAGGCTTCAAGGCCAGCACTGGCTTTGGGTCCA ACACCAAAAACAAGAAGATATACGATGGAGGTGCCCGCACAGAGGACGAGGTACAATCTTATCCTTCCAA GCACGACTATGTGTAA
#8	tgcgccaccatggccgtgactgcctgtcagggcttggggttcgtggtttcactgattggg attgcgggcatcattgctgccacctgcatggaccagtggagcacccaagacttgtacaac aaccccgtaacagctgttttcaactaccaggggctgtggcgctcctgtgtccgagagagc
#16	MAVTACQGLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLL GLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFA NMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVS YHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV*
#17	DQWSTQDLYN
#18	NNPVTAVFNYQ
#19	MAVTACQGLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQ
#39	GGTTCGTGGTTTCACTGATTGGGATTGC
#40	CGGCTTTGTAGTTGGTTTCTTCTGGTG
#107	TGTTTTCAACTACCAGGGGC
#108	TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC
#109	GAGGCAGAGTTCAGGCTTCACCGA
#110	TGTTGGCTTTGGCAGAGTCC
#111	TGMDMWSTQDLYDNPVTSVFQYEGLWRSCVRQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVR
#112	DQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLL GLPAMLQAVR
#113	STQDLYNNPVTAVF
#114	DMWSTQDLYDNP
#115	CRPYFTILGLPA
#116	TNFWMSTANMYTG
#117	gccaggatca tgtccaccac cacatgccaa gtggtggcgt tcctcctgtc catcctgggg ctggccggct gcatcgcggc caccgggatg gacatgtgga gcacccagga cctgtacgac aaccccgtca cctccgtgtt ccagtacgaa gggctctgga ggagctgcgt gaggcagagt tcaggcttca ccgaatgcag gccctatttc accatcctgg gacttccagc catgctgcag gcagtgcgag ccctgatgat cgtaggcatc gtcctgggtg ccattggcct cctggtatcc atctttgccc tgaaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgccaa agccaacatg acactgacct ccgggatcat gttcattgtc tcaggtcttt gtgcaattgc tggagtgtct gtgtttgcca acatgctggt gactaacttc tggatgtcca cagctaacat gtacaccggc atgggtggga tggtgcagac tgttcagacc aggtacacat ttggtgcggc tctgttcgtg ggctgggtcg ctggaggcct cacactaatt gggggtgtga tgatgtgcat cgcctgccgg ggcctggcac cagaagaaac caactacaaa gccgtttctt atcatgcctc aggccacagt gttgcctaca agcctggagg cttcaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccaaaaac aagaagatat acgatggagg tgcccgcaca gaggacgagg tacaatctta tccttccaag cacgactatg tgtaatgctc taagacctct cagcac
#118	MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVF QYEGLWRSCVRQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALK CIRIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGG MVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSV AYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV
#119	gccaggatca tgtccaccac cacatgccaa gtggtggcgt tcctcctgtc catcctgggg ctggccggct gcatcgcggc caccgggatg gacatgtgga gcacccagga cctgtacgac aaccccgtca cctccgtgtt ccagtacgaa gggctctgga ggagctgcgt gaggcagagt

	tcaggcttca ccgaatgcag gccctatttc accatcctgg gacttcc
#120	MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVFQYEGLWRSCVRQSSGFTECRPYFTI
#137	NMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFG
#142	almivgivlgaiglllvsifalkcirigsmedsakanmtltsgimfivsglcaiagvsvfanmlvtnfwmst anmytgmggmvqtvqtrytfgaalfvgwvaggltliggvmmciac
#143	rigsmedsakanmtltsgimfivs
#144	Akanmtlt
#145	Medsakanmtltsg
#146	Medsakadmtltsg
#147	sakadmtlt
#148	akadmtltl
#149	DQWSTQDLYDNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVR
#150	STQDLYDNPVTAVF

Fig. 15

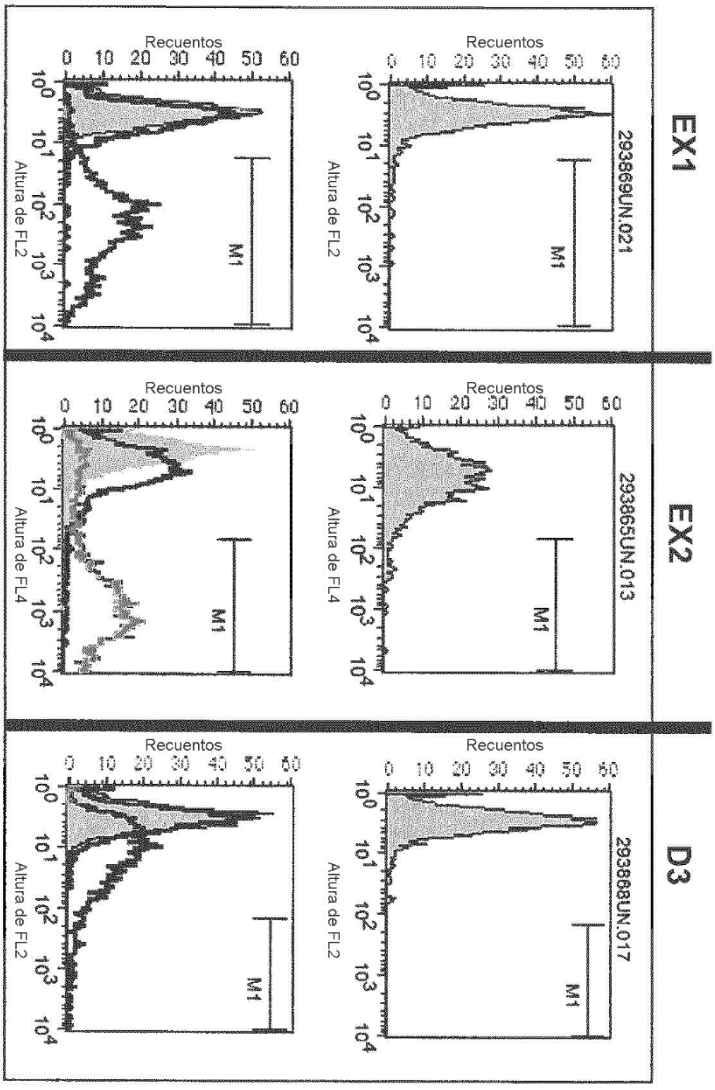
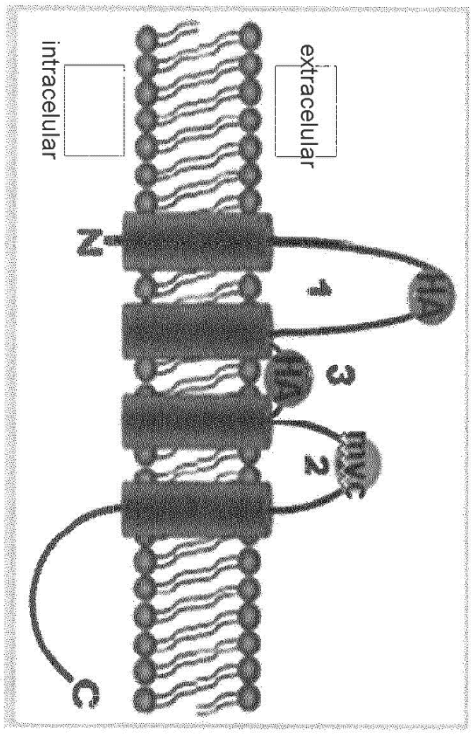

extracelular
intracelular
N
C
1
2
3
EX1
EX2
D3
Recuentos
Altura de FL2
Altura de FL4
M1
293869UN.021
293865UN.013
293868UN.017
Controles
Células transferidas

Fig. 16


Cáncer
extracelular
intracelular
N
C
1
2
3
MYC

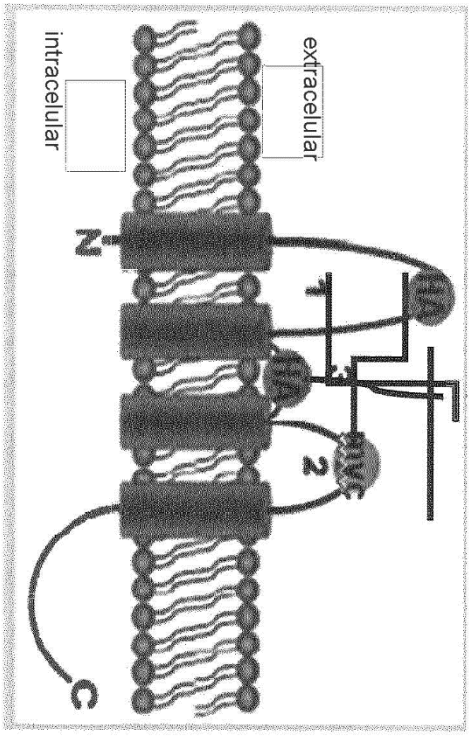
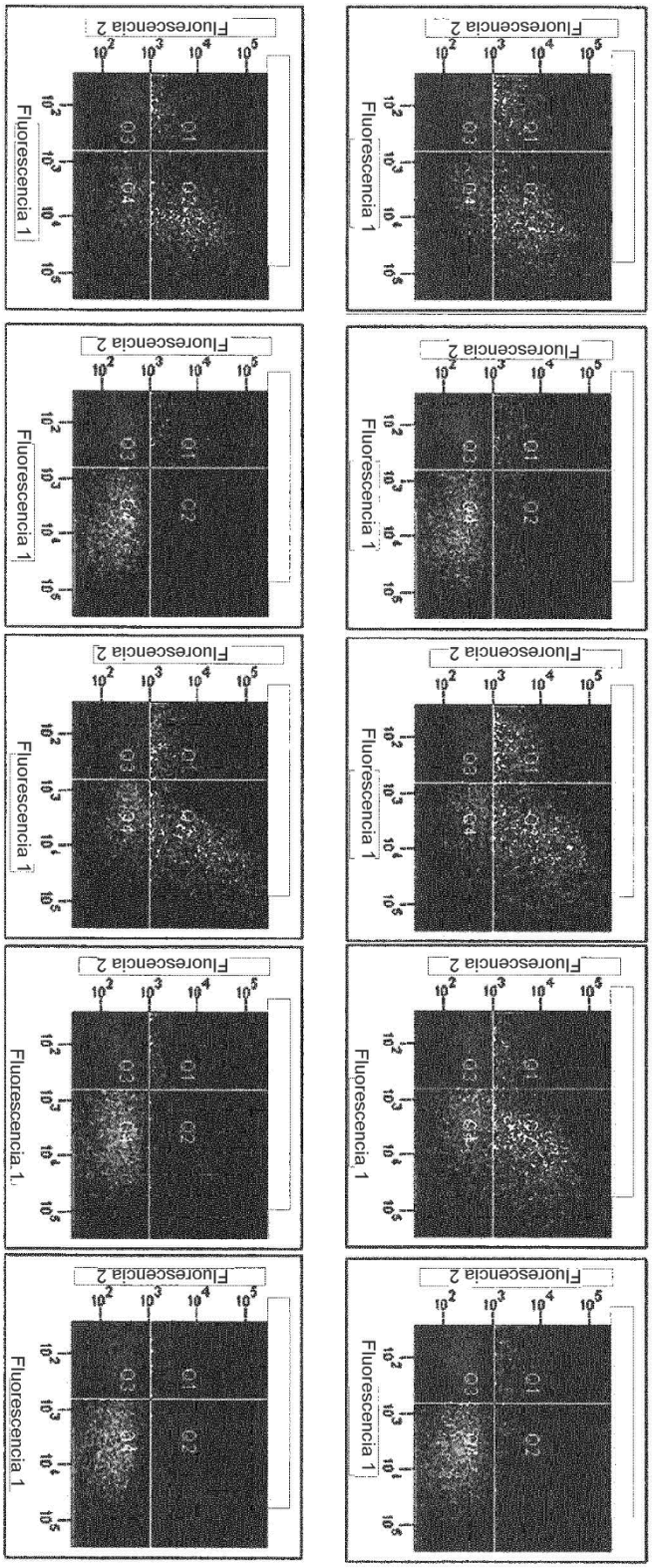

Tejido normal
extracelular
intracelular
N
C
1
2
MYC

Fig. 17


Claudina 18A2
Claudina 18A1
Claudina 18A2
Myc-tag en Ex2
Claudina 18A2
HA-tag en Ex1
Simulación
Control negativo
mAB1
mAB2
Fluorescencia 1
Fluorescencia 2
Q1
Q2
Q3
Q4