

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 705**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2004** E 10009753 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** EP 2267012

54 Título: **Identificación de antígenos de superficie celular, asociados a tumor para diagnóstico y terapia**

30 Prioridad:

26.09.2003 DE 10344799

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

28.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TÜRECI, ÖZLEM;
SAHIN, UGUR;
HELFTENBEIN, GERD y
SCHLÜTER, VOLKER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 634 705 T3

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

DESCRIPCIÓN

Identificación de antígenos de superficie celular, asociados a tumor para diagnóstico y terapia

5 A pesar de los enfoques interdisciplinarios y el uso exhaustivo de modalidades terapéuticas clásicas, los cánceres todavía se encuentran entre las causas importantes de muerte. Los conceptos terapéuticos más recientes van dirigidos a incluir el sistema inmune propio del paciente en el concepto terapéutico total usando vacunas recombinantes de tumores y otras medidas específicas como terapia con anticuerpo. Un prerrequisito para el éxito de una estrategia de este tipo es el reconocimiento de epítomos o antígenos específicos de un tumor o asociados a tumor por parte del sistema inmune del paciente cuyos efectos o funciones tienen que intensificarse mediante intervención. Las células tumorales se diferencian biológicamente en esencia de sus células de origen no malignas. 10 Estas diferencias se deben a modificaciones genéticas adquiridas durante el desarrollo del tumor y también conducen, entre otros, a la formación de estructuras moleculares modificadas de modo cualitativo y cuantitativo en las células cancerosas. Las estructuras de este tipo, asociadas a un tumor, que se reconocen por el sistema inmune específico del hospedero que lleva el tumor son denominadas antígenos asociados a tumor.

15 En el reconocimiento específico de antígenos asociados a tumor participan mecanismos celulares y humorales que representan dos unidades funcionalmente entrecruzadas entre sí: los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ T reconocen antígenos procesados que se presentan sobre las moléculas del MHC (Major Histocompatibility complex = antígenos de histocompatibilidad) de clases II y I respectivamente, mientras que los linfocitos B producen moléculas circulantes de anticuerpo que se enlazan directamente con antígenos no procesados.

20 El significado terapéutico-clínico potencial de antígenos asociados a tumor resulta del hecho de que el reconocimiento de antígenos en células neoplásicas por el sistema inmune conduce a la iniciación de mecanismos efectores citotóxicos y en presencia de células auxiliares T pueden causar la eliminación de las células cancerosas (Pardoll, Nat. Med. 4:525-31, 1998). Por consiguiente, una finalidad central de la inmunología tumoral es definir molecularmente estas estructuras. La naturaleza molecular de estos antígenos ha sido un enigma por mucho tiempo. Sólo después de haber desarrollado técnicas de clonación apropiadas, mediante análisis de estructuras 25 diana de linfocitos T citotóxicos (CTL) (van der Bruggen et al., Science 254:1643-7, 1991) o con anticuerpos circulantes (Sahin et al., Curr. Opin. Immunol. 9:709-16, 1997) como sondas, ha sido posible cribar de manera sistemática bibliotecas de expresión de ADNc de tumores para antígenos asociados a tumor. Para este propósito, se prepararon bibliotecas de expresión de ADNc a partir de tejido tumoral fresco y expresado de modo recombinante como proteínas en sistemas adecuados. Con el fin de clonar los antígenos respectivos se utilizaron inmunofectores 30 aislados de pacientes, más precisamente clones de CTL con patrones de lisis específicos de un tumor, o anticuerpos circulantes.

35 Por medio de estas estrategias durante los últimos años ha sido definida una gran cantidad de antígenos en diversas neoplasias. En este caso, la clase de los antígenos testiculares de cáncer (CTA por Cancer/Testis-Antigene) es de gran interés. CTA y los genes que los codifican (genes testiculares de cáncer o CTG por Cancer/Testis-Gene9 se definen por su patrón de expresión característico (Tureci et al, Mol. Med. Today 3:342-9, 1997). No se encuentran en tejidos normales, excepto en testículos y células germinativas, aunque se expresan en una serie de malignomas humanos aunque no de manera específica para el tumor sino con frecuencia diferente en las entidades tumorales de orígenes muy diferentes (Chen & Old, Cancer J. Sci. Am. 5:16-7, 1999). Las reactividades de suero contra CTA 40 tampoco se encuentran en controles sanos, sino solamente en pacientes con tumor. Esta clase de antígenos, principalmente debido a su distribución tisular, es particularmente valiosa para proyectos inmunoterapéuticos y en la actualidad se ensaya en los estudios clínicos actuales corrientes (Marchand et al., Int. J. Cancer 80:219-30, 1999; Knuth et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 46: S46-51, 2000).

45 Sin embargo, los procedimientos clásicos presentados antes para la identificación de antígenos en calidad de sondas utilizan inmunofectores (autoanticuerpos circulantes o clones de CTL) de pacientes que tienen por lo regular un cáncer ya avanzado. De una serie de datos se desprende que los tumores pueden conducir, por ejemplo, a la inducción de tolerancia y anergia de las células T y a que ya en el transcurso de la enfermedad se pierdan aquellas especialidades del repertorio de inmunofectores que pueden causar un efectivo inmunoreconocimiento. A partir de los estudios actuales en pacientes todavía no se ha revelado una evidencia segura de una acción real de los antígenos, asociados a tumores, que se han descubierto y utilizado hasta ahora. Por consiguiente, no puede 50 excluirse que las proteínas que evocan respuestas inmunes espontáneas son estructuras dianas equivocadas.

El objetivo de la presente invención fue suministrar estructuras dianas para un diagnóstico y una terapia de enfermedades cancerosas.

De acuerdo con la invención, este objetivo se logra mediante el objeto de las reivindicaciones.

55 De acuerdo con la invención, ha sido seguida una estrategia para una identificación y suministro de antígenos expresados de modo asociado a un tumor y de los ácidos nucleicos que los codifican. Esta estrategia se basa en la evaluación de bases de datos de proteínas y ácidos nucleicos humanos con respecto a antígenos potenciales, específicos de un cáncer, que son accesibles sobre la superficie de la célula. La definición de los criterios de filtro

que son necesarios para esto, junto con una metodología con un alto rendimiento para analizar todas las proteínas posibles forman el componente central de la invención. Por medio de minería de datos se establece primero una lista, tan completa como es posible, de todos los genes conocidos que son examinados para la presencia de uno o más dominios transmembrana de acuerdo con el principio básico de gen a ARNm a proteína. A esto le sigue una búsqueda de homología, una clasificación de los aciertos en los grupos específicos de un tejido (entre otros, tejido tumoral) y una verificación de la existencia real del ARNm. Finalmente, las proteínas que se identifican de esta manera son evaluadas para su activación aberrante en tumores, por ejemplo mediante análisis de expresión y procedimientos químicos de proteína.

La minería de datos es un procedimiento conocido para la identificación de genes asociados a tumor. En el caso de estrategias convencionales, no obstante, las transcripciones de bancos de tejidos normales se sustraen electrónicamente de los bancos de tejidos tumorales, con la suposición de que los genes restantes son específicos a un tumor (Schmitt et al., *Nucleic Acids Res.* 27:4251-60, 1999; Vasmatazis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:300-4, 1998; Scheurle et al., *Cancer Res.* 60:4037-43, 2000).

El concepto de la invención se basa, no obstante, en utilizar minería de datos para la extracción electrónica de todos los genes que codifican antígenos específicos de cáncer, accesibles sobre la superficie celular, y luego evaluar estos para la expresión ectópica en tumores.

Por lo tanto, en la presente se divulga una estrategia para la identificación de genes expresados de manera diferencial en tumores. Ésta combina minería de datos de bases de secuencias públicas ("in silico") con estudios experimentales subsiguientes en el laboratorio ("wet bench") para evaluación.

Una estrategia combinada a base de diferentes secuencias de comandos bioinformáticos de acuerdo con la invención hizo posible la identificación de genes que codifican antígenos específicos de cáncer, accesibles sobre la superficie celular. La identificación y el suministro de estos genes asociados a tumores y de los productos codificados por estos se efectuó de acuerdo con la invención de manera independiente de su efecto inmunogénico.

Los antígenos asociados a tumores, identificados de acuerdo con la invención, presentan una secuencia de aminoácidos que es codificada por un ácido nucleico, la cual se selecciona del grupo compuesto por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico, que se selecciona del grupo compuesto por SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, una parte o un derivado del mismo, (b) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con el ácido nucleico del literal (a), (c) un ácido nucleico que se degenera con respecto al ácido nucleico del literal (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico del literal (a), (b) o (c). En una forma preferida de realización, un antígeno asociado tumor, identificados de acuerdo con la invención, presenta una secuencia de aminoácidos que se codifican por un ácido nucleico según SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias. En otra forma preferida de realización, un antígeno asociado tumor, que se identifica de acuerdo con la invención, comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por SEQ ID NOs: 10, 284, 285 y 286 del listado de secuencias, una parte o un derivado de la misma.

La presente invención se refiere en términos generales al uso de antígenos asociados a tumor, identificados de acuerdo con la invención, o de partes de los mismos, de ácidos nucleicos que los codifican o de ácidos nucleicos que están dirigidos contra los ácidos nucleicos codificante, o de anticuerpos que están dirigidos contra los antígenos asociados a tumor, identificados de acuerdo con la invención, o partes de estos, para la terapia y diagnóstico. Esta utilización puede referirse a antígenos individuales, aunque también a combinaciones de varios de estos antígenos, fragmentos funcionales, ácidos nucleicos, anticuerpos, etc. en una forma de realización también en combinación con otros genes y antígenos asociados a tumor para un diagnóstico, una terapia y control de seguimiento.

La propiedad de los antígenos asociados a tumor, identificados de acuerdo con la invención, de que se localizan sobre o en la superficie celular los califica como dianas o medios adecuados para terapia y diagnóstico. Una parte de los antígenos asociados a tumor, identificados de acuerdo con la invención, que es particularmente adecuada para esto, corresponde a la parte que no es de transmembrana; corresponde principalmente a la fracción extracelular de los antígenos o está comprendida por ésta. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, para terapia o diagnóstico se prefiere una parte de los antígenos asociados a tumor, identificados de acuerdo con la invención, que corresponde a la fracción de no-transmembrana de los antígenos, o que está comprendida por esta, o una parte correspondiente de los ácidos nucleicos que codifican los antígenos asociados al tumor, identificados de acuerdo con la invención. De modo similar, se prefiere el uso de anticuerpos que están dirigidos contra una parte de los antígenos asociados a tumor, que se identifican de acuerdo con la invención, la cual corresponde a la fracción de no- tras membrana de los antígenos, o está comprendida por esta.

Las enfermedades que se prefieren para una terapia y/o diagnóstico son aquellas en las cuales se presenta una expresión selectiva o una expresión anormal de uno o varios de los antígenos asociados al tumor, que se identifican de acuerdo con la invención.

La presente divulgación también se refiere a ácidos nucleicos y a productos génicos que se expresan en asociación con una célula tumoral y que se producen mediante corte y empalme modificado (variantes de corte y empalme) de

genes o mediante traducción modificada utilizando marcos de lectura abierta alternativos. Estos ácidos nucleicos comprenden la secuencia según SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias. Además, los productos génicos comprenden todas las secuencias de acuerdo con SEQ ID NOs: 10, 284, 285 y 286 del listado de secuencias. Las variantes de corte y empalme pueden usarse como dianas para el diagnóstico y la terapia de enfermedades tumorales.

Los más diversos mecanismos pueden causar la generación de variantes de corte y empalme, por ejemplo

- la utilización de sitios variables de iniciación de transcripción

- la utilización de exones adicionales

- corte y empalme completos o incompletos de exones individuales o de varios exones,

10 - secuencias reguladoras de corte y empalme, modificadas mediante mutación (supresión o creación de nuevas secuencias donantes/receptoras),

- la eliminación incompleta de secuencias de intrones.

15 El corte y empalme modificados de un gen conduce a una secuencia de transcripción modificada (variante de corte y empalme). La traducción de una variante de corte y empalme en la región de su secuencia modificada da lugar a una proteína modificada que puede ser ostensiblemente diferente en la estructura y la función de la proteína original. En el caso de las variantes de corte y empalme asociadas a un tumor pueden originarse transcripciones asociadas a tumores y a proteínas/antígenos asociados a tumores. Éstos pueden utilizarse como marcadores moleculares, tanto para detectar células tumorales como también para direccionamiento terapéutico a tumores. La detección de células tumorales, por ejemplo en sangre, suero, médula ósea, esputo, lavado bronquial, secreciones corporales y biopsias tisulares puede efectuarse según la invención, por ejemplo, después de extracción de ácidos nucleicos mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de las variantes de corte y empalme.

20 De acuerdo con la invención, para la detección son adecuados todos los sistemas de detección dependientes de secuencia. Además de la PCR, estos son, por ejemplo, sistemas de chip génico/chip de ADN, Northern-Blot, ensayos de protección de ARNasa (RDA) y otros. Todos los sistemas de detección tienen en común que la detección se basa en una hibridación específica con al menos una secuencia de ácido nucleico específica a la variante de corte y empalme. Sin embargo, las células tumorales también pueden detectarse de acuerdo con la invención por parte de anticuerpos que reconocen un epítipo específico codificado por la variante de corte y empalme. Para la preparación de los anticuerpos pueden usarse péptidos para inmunización que son específicos para estas variantes de corte y empalme. Para la inmunización son particularmente adecuados los aminoácidos que presentan diferencias de epítipo ostensible frente a su(s) variante(s) del producto génico, que se forma(n) preferiblemente en células sanas. La detección de las células tumorales con anticuerpos puede efectuarse aquí sobre una muestra aislada del paciente o como imagenología con anticuerpos aplicados por vía intravenosa.

25 Además de la utilidad diagnóstica, las variantes de corte y empalme que tienen epítopos nuevos o modificados son dianas atractivas para la inmunoterapia. Los epítopos de acuerdo con la invención pueden utilizarse para direccionar anticuerpos monoclonales con efecto terapéutico o linfocitos T. En la inmunoterapia pasiva se transfieren de modo adoptivo anticuerpos o linfocitos T que reconocen epítopos específicos de las variantes de corte y empalme. La generación de anticuerpos puede efectuarse tal como en el caso de otros antígenos, utilizando también tecnologías estándar (inmunización de animales, estrategias de cribado para aislamiento de anticuerpo recombinantes) utilizando polipéptidos que incluyen estos epítopos. Como alternativa, para la inmunización pueden utilizarse ácidos nucleicos que codifican oligo- o polipéptidos que incluyen estos epítopos. Diferentes técnicas para generación in vitro o in vivo de linfocitos T específicos de epítipo son conocidas y descritas detalladamente (por ejemplo en Kessler JH, et al. 2001, Sahin et al., 1997) y también se basan en la utilización de oligo- o polipéptidos que incluyen epítopos específicos para variantes de corte y empalme, o ácidos nucleicos que los codifican. Los oligo- o polipéptidos que incluyen epítopos o los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos también pueden usarse para la utilización como sustancias con efecto farmacéutico en la inmunoterapia activa (vacunación, terapia con vacuna).

35 La expresión aberrante de genes en células tumorales puede basarse en patrones de metilación modificados de sus promotores (De Smet C et al., Mol Cell Biol. 24(11):4781-90, 2004; De Smet C et al., Mol Cell Biol. 19(11):7327-35, 1999; De Smet C et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 93(14):7149-53, 1996). Estas diferencias en metilación pueden usarse como marcadores indirectos para el estado modificado del gen correspondiente. Por consiguiente, para propósitos diagnósticos puede usarse el incremento o la disminución de metilaciones de base en la región del promotor.

40 En un aspecto se describe una composición farmacéutica que comprende un producto que reconoce el antígeno asociado a un tumor que se identifica de acuerdo con la invención y el cual es preferiblemente selectivo para células que tienen expresión o expresión anormal de un antígeno asociado tumor que ha sido identificado de acuerdo con la

invencción. En determinadas formas de realización, el producto puede causar la inducción de muerte celular, la reducción del crecimiento celular, el daño a la membrana celular o la secreción de citocinas y tiene preferiblemente una actividad inhibitoria de tumor. En una forma de realización, el producto no es un ácido nucleico antisentido que hibrida selectivamente con el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el producto es un anticuerpo que se enlaza selectivamente al antígeno asociado al tumor, principalmente un anticuerpo activado por complemento que se enlaza selectivamente al antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el producto comprende dos o más productos que reconocen, cada uno, de manera selectiva diferentes antígenos asociados a tumor y al menos uno de los antígenos asociados a tumor es un antígeno asociado a un tumor que se identifican de acuerdo con la invencción. El reconocimiento no tiene que estar directamente acompañado de una inhibición de actividad o expresión del antígeno. En este aspecto de la invencción, el antígeno limitado selectivamente a tumores sirve preferiblemente como una etiqueta para alistar mecanismos efectores en este sitio específico. En una forma preferida de realización, el producto es un linfocito T citotóxico que reconoce el antígeno en una molécula de HLA y lisa las células marcadas de este modo. En otra forma de realización, el producto es un anticuerpo que se enlaza selectivamente al antígeno asociado al tumor y, por lo tanto, alista mecanismos efectores naturales o artificiales para esta célula. En otra forma de realización, el producto es un linfocito T auxiliar que fortalecer las funciones efectoras de otras células que reconocen específicamente este antígeno.

Es un aspecto, la invencción se refiere una composición farmacéutica que comprende un producto que inhibe la expresión o la actividad de un antígeno asociado a un tumor que se identifica de acuerdo con la invencción. En una forma preferida de realización, el producto es un ácido nucleico antisentido que se hibrida selectivamente con el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el producto es un anticuerpo que se enlaza selectivamente al antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el producto comprende varios productos que inhiben respectivamente de modo selectivo la expresión o la actividad de diferentes antígenos asociados al tumor, y al menos uno de los antígenos asociados al tumor es un antígeno asociado al tumor que se ha identificado de acuerdo con la invencción.

La actividad de un antígeno asociado a un tumor, que se ha identificado de acuerdo con la invencción, puede ser una actividad cualquiera de una proteína o de un péptido. De esta manera, los métodos terapéuticos y diagnósticos de acuerdo con la invencción también pueden apuntar a inhibir o a reducir esta actividad o a ensayar esta actividad.

Además, se describe una composición farmacéutica que comprende un producto que al suministrarse incrementa selectivamente la cantidad de complejos entre una molécula de HLA y un epítipo de péptido del antígeno asociado al tumor que se ha identificado de acuerdo con la invencción. En una forma de realización, el producto comprende uno o varios componentes que se seleccionan del grupo de (i) el antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, (ii) un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, (iii) una célula hospedera que expresa el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, y (iv) complejos aislados entre epítopos de péptido del antígeno asociado al tumor y una molécula de MHC. En una forma de realización, el producto comprende varios productos que incrementan selectivamente la cantidad de complejos entre moléculas de MHC y epítopos de péptido de diferentes antígenos asociados al tumor, y al menos uno de los antígenos asociados al tumor es un antígeno asociado al tumor que ha sido identificado de acuerdo con la invencción.

La invencción se refiere además a una composición farmacéutica que comprende uno o varios componentes que se seleccionan del grupo compuesto por (i) un antígeno asociado a un tumor que se identifica de acuerdo con la invencción, o una parte del mismo, (iii) un anticuerpo que se enlaza con un antígeno asociado a un tumor que se identifica de acuerdo con la invencción, o una parte del mismo, (iv) un ácido nucleico antisentido que se hibrida específicamente con un ácido nucleico el cual codifica un antígeno asociado un tumor identificado de acuerdo con la invencción, (v) una célula hospedera que expresa un antígeno asociado a un tumor identificado de acuerdo con la invencción o una parte del mismo, y (vi) complejos aislados entre un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invencción, o una parte del mismo y una molécula de HLA.

Un ácido nucleico, que codifica un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invencción, o una parte del mismo, puede estar presente en la composición farmacéutica en un vector de expresión y estar enlazado con un promotor de modo funcional.

Una célula hospedera contenida en una composición farmacéutica de acuerdo con la invencción puede secretar el antígeno asociado al tumor o a la parte del mismo, expresar sobre la superficie y adicionalmente puede expresar una molécula de HLA que se enlaza con el antígeno asociado al tumor, o con una parte del mismo. En una forma de realización, la célula hospedera expresa de modo endógeno la molécula de HLA. En otra forma de realización, la célula hospedera expresa de modo recombinante la molécula de HLA y/o el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo. Preferiblemente, la célula hospedera no es proliferativa. En una forma preferida de realización, la célula hospedera es una célula que presenta el antígeno, principalmente una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

Un anticuerpo contenido en una composición farmacéutica de acuerdo con la invencción 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 que pueden prepararse mediante técnicas combinatorias. El anticuerpo puede acoplarse con un producto útil desde el punto de vista terapéutico o diagnóstico.

5 Un ácido nucleico antisentido contenido en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de 6-50, principalmente de 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos continuos del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor identificado de acuerdo con la invención.

En otras formas de realización, un antígeno asociado a un tumor, o una parte del mismo, proporcionado mediante una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se enlaza directamente o por medio de la expresión de un ácido nucleico a una molécula de MHC sobre la superficie de células, en cuyo caso el enlace provoca preferiblemente una reacción citotóxica y/o induce una emisión de citocinas.

10 Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender un soporte compatible farmacéuticamente y/o un adyuvante. El adyuvante puede seleccionarse de saponina, GM-CSF, CpG-oligonucleótidos, ARN, una citocina o una quimiocina. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se emplea preferiblemente para el tratamiento de una enfermedad que se caracteriza por una expresión selectiva o una expresión anormal de un antígeno asociado a un tumor. En una forma preferida de realización, la enfermedad es
15 cáncer.

La invención se refiere además a métodos para el tratamiento, diagnóstico o monitoreo, es decir la determinación de la regresión, el progreso y/o el inicio de una enfermedad que se caracterizan por la expresión o la expresión anormal de uno o de varios antígenos asociados a un tumor.

20 En una forma de realización, los procedimientos de tratamiento según la invención comprenden la administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

Los procedimientos de diagnóstico y/o procedimientos de monitoreo de acuerdo con la invención se refieren en forma general al uso de productos para la detección y/o la determinación o monitoreo de la cantidad (i) de un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor, o una parte del mismo y/o (ii) del antígeno asociado al tumor o de una parte del mismo, y/o (iii) de un anticuerpo contra el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y/o (iv) de linfocitos T citotóxicos o auxiliares que son específicos para el antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, en una muestra biológica aislada de un paciente.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad que se caracteriza por la expresión o la expresión anormal de un antígeno asociado un tumor, identificado de acuerdo con la invención. El procedimiento comprende (i) la detección de 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 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 auxiliares que son específicos para el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo en una muestra biológica aislada de un paciente. En determinadas formas de realización, la detección comprende (i) poner en contacto la muestra biológica con un producto que se enlaza específicamente al ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o a la parte del mismo, al antígeno asociado al tumor o a la parte del mismo, al anticuerpo o a linfocitos T citotóxicos o auxiliares que son específicos para el antígeno asociado al tumor o a partes del mismo y (ii) la detección de la formación de complejo entre el producto y el ácido nucleico con la parte del mismo, el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo, el anticuerpo o los linfocitos T citotóxicos o auxiliares. En una forma de realización, la enfermedad se caracteriza por la expresión o expresión anormal de varios diferentes antígenos asociados al tumor y la detección comprende una detección de varios ácidos nucleicos que codifican varios diferentes antígenos asociados al tumor o partes de los mismos; comprende la detección de los varios diferentes antígenos asociados al tumor o de partes del mismo; comprende la detección de varios anticuerpos que se enlazan a los varios diferentes antígenos asociados al tumor o a partes de los mismos, o comprende la detección de varios linfocitos T citotóxicos u auxiliares que son específicos para los varios diversos antígenos asociados al tumor. En otra forma de realización se compara la muestra biológica aislada del paciente con una muestra biológica normal comparable.

Los métodos de diagnóstico de acuerdo con la invención también pueden utilizar patrones de metilación modificados de la región promotora del producto génico respectivo asociado al tumor. La detección de tales patrones de metilación puede efectuarse usando métodos con base en PCR, con la ayuda de enzimas de restricción o mediante secuenciación. Un ensayo adecuado para esto puede estar estructurado tal como sigue: (1) extracción de ADN de muestras tisulares de pacientes, por ejemplo utilizando material incrustado en parafina, (2) tratamiento del ADN con reactivos que contienen bisulfito (por ejemplo tal como se describe en Clark SJ et al., Nucleic Acids Res. 22(15):2990-7, 1994), (3) amplificación de ADN con PCR, y (4) análisis mediante determinación de la cantidad de productos de amplificación específicos a la secuencia (por ejemplo mediante PCR cuantitativo, procedimientos de hibridación tales como procedimientos de chips de ADN).

Los procedimientos de diagnóstico de acuerdo con la invención también pueden referirse a una utilización de los antígenos asociados a tumor, identificados de acuerdo con la invención, como marcadores de pronóstico con el fin

de predecir una metástasis, por ejemplo mediante ensayos de la conducta de migración de las células y, por lo tanto, un curso de la enfermedad empeorado, por lo cual entre otras se hace posible planificar una terapia más agresiva.

En otro aspecto, la invención se refiere un procedimiento para determinar la regresión, el curso o el inicio de una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado un tumor, identificado de acuerdo con la invención, el cual comprende el monitoreo de una muestra de un paciente que presenta la enfermedad o del que se sospecha puede contraer la enfermedad respecto de uno o de varios parámetros que se seleccionan del grupo compuesto por (i) la cantidad del 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 del anticuerpo que se enlaza al antígeno asociado al tumor, o a una parte del mismo, y (iv) la cantidad de células T citolíticas o células T auxiliares que son específicas para un complejo entre el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y una molécula de MHC. El procedimiento comprende preferiblemente la determinación del o de los parámetros en un primer momento en una primera muestra y en un segundo momento en otra muestra, y se determina el curso de la enfermedad comparando ambas muestras. En determinadas formas de realización, la enfermedad se caracteriza por la expresión o expresión anormal de varios diferentes antígenos asociados a tumor y el monitoreo comprende un monitoreo (i) de la cantidad de varios ácidos nucleicos que codifican varios diferentes antígenos asociados a tumor, o de partes de los mismos y/o (ii) de la cantidad de los varios diversos antígenos asociados a tumor o de partes de los mismos y/o (iii) de la cantidad de varios anticuerpos que se enlazan a los varios diversos antígenos asociados a tumor o a partes de los mismos, y/o (iv) de la cantidad de varias células T citolíticas o células T auxiliares, que son específicas para complejos entre los varios diversos antígenos asociados a tumor o de las partes de los mismos y moléculas de MHC.

La detección de un ácido nucleico o de una parte del mismo o una determinación o monitoreo de la cantidad de un ácido nucleico o una parte del mismo puede efectuarse de acuerdo con la invención con una sonda de polinucleótido que se hibrida específicamente con el ácido nucleico o la parte del mismo, o puede efectuarse mediante amplificación selectiva del ácido nucleico o de la parte del mismo. En una forma de realización, la sonda de polinucleótido comprende una secuencia de 6-50, principalmente de 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos continuos del ácido nucleico.

En determinadas formas de realización de los procedimientos de diagnóstico se efectúa una amplificación selectiva de la región promotora o de una parte de la misma de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado un tumor, identificado de acuerdo con la invención, y se encuentra presente en forma de ADN genómico, después del tratamiento con un reactivo que contiene bisulfito. El ácido nucleico se aísla preferiblemente antes de un tratamiento con el reactivo que contiene bisulfito de una muestra de un paciente que va a estudiarse. Los oligonucleótidos usados en el caso de una amplificación de este tipo presentan preferiblemente una secuencia que se enlaza al ácido nucleico tratado con un reactivo que contiene bisulfito y preferiblemente son complementarios a este. De preferencia, los oligonucleótidos se adaptan a un grado de metilación del ácido nucleico y causan productos de amplificación diferenciables.

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

En formas determinadas de realización, el antígeno asociado al tumor, que va a detectarse, o la parte del mismo, se encuentra presente en un complejo con una molécula de MHC, principalmente una molécula de HLA.

Una detección de un anticuerpo por la determinación o monitoreo de la cantidad de anticuerpos puede efectuarse de acuerdo con la invención con una proteína o péptido que se enlazan de manera específica al anticuerpo.

Una detección de células T citolíticas o células T auxiliares o la determinación o monitoreo de la cantidad de células T citolíticas o células T auxiliares que son específicas para complejos entre un antígeno o una parte del mismo y moléculas de MHC, puede efectuarse con una célula de acuerdo con la invención, la cual presenta el complejo entre el antígeno o la parte del mismo y una molécula de MHC.

La sonda de polinucleótido, el anticuerpo, la proteína o el péptido o la célula que se usan para una detección o para una determinación o monitoreo preferiblemente son marcados de manera detectable. En determinadas formas de realización el marcador detectable es un marcador radioactivo o un marcador de enzima. La detección de linfocitos T puede efectuarse adicionalmente detectando su proliferación, su producción de citocina, así como su actividad citotóxica provocada por la estipulación específica con el complejo de MHC y el antígeno asociado al tumor o partes del mismo. La detección de linfocitos T puede efectuarse además mediante una molécula recombinante de MHC o también un complejo de varias moléculas de MHC que se cargan con el respectivo fragmento inmunogénico de uno o de varios de los antígenos asociados al tumor y pueden identificar linfocitos T específicos poniéndose en contacto con el receptor específico de célula T.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para tratar, diagnosticar o monitorear una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado un tumor, identificado de acuerdo

con la invención, que comprende la administración de un anticuerpo el cual se enlaza al antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo y se acopla con un producto terapéutico o de diagnóstico. 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.

5 La invención también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad, la cual se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invención, que comprende (i) el retiro de una muestra con células inmunoreactivas del paciente, (ii) la puesta en contacto de la muestra con una célula hospedera 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. La invención también se refiere a la clonación del receptor de células T de células T citolíticas contra el antígeno asociado al tumor. Este puede transferirse a otras células T que con esto obtienen la especificidad deseada y pueden introducirse al paciente según (iii).

15 En una forma de realización, la célula hospedera presa de manera endógena una molécula de HLA. En otra forma de realización, la célula hospedera expresa de modo recombinante una molécula de HLA y/o el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo. De preferencia, la célula hospedera es no proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula hospedera es una célula que presenta antígeno, principalmente una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

20 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento para tratar un paciente que tiene una enfermedad que se caracteriza por la expresión o la expresión anormal de un antígeno asociado a un tumor, el cual comprende (i) la identificación de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invención, el cual es expresado por células que están asociadas con la enfermedad, (ii) la transfección de una célula hospedera con el ácido nucleico o una parte del mismo, (iii) el cultivo de la célula hospedera transfectada para una expresión del ácido nucleico (esto no es obligatorio al alcanzar una tasa alta de transfección) y (iv) la introducción de las células hospederas o de un extracto de las mismas en el paciente, en una cantidad que es adecuada para incrementar la reacción inmune contra las células del paciente que están asociadas con la enfermedad. El procedimiento puede comprender además la identificación de una molécula de MHC que presenta el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, y la célula hospedera expresa la molécula de MHC identificada y presenta el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo. La reacción inmune puede comprender una reacción de células B o una reacción de células T. Además, una reacción de células T puede comprender la producción de células T citolíticas y/o células T auxiliares que son específicas para las células hospederas que presentan el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo o son específicas para células del paciente, las cuales expresan el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo.

35 La enseñanza técnica divulgada también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invención, el cual comprende (i) la identificación de células del paciente que expresan cantidades anormales del antígeno asociado al tumor, (ii) el aislamiento de una muestra de las células, (iii) el cultivo de las células y (iv) la introducción de las células en el paciente en una cantidad que es adecuada para provocar una reacción inmune contra las células.

Las células hospederas usadas de acuerdo con la invención son preferiblemente no proliferativas o se hacen no proliferativas. Una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a un tumor es principalmente cáncer.

45 Además, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, una parte o un derivado del mismo, (b) un ácido nucleico que en condiciones severas se hibrida con el ácido nucleico según (a), (c) un ácido nucleico que está degenerado con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c). Además, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por SEQ ID NOs: 10, 284, 285 y 286 del listado de secuencias, una parte o un derivado del mismo.

En otro aspecto, la presente enseñanza técnica se refiere a secuencias promotor de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Éstas pueden enlazarse con un gen, de preferencia en un vector de expresión y garantizan por lo tanto la expresión selectiva de este gen en células correspondientes.

55 En otro aspecto, la presente enseñanza técnica se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante, principalmente una molécula de ADN o ARN que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

La invención también se refiere a células hospederas que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención o una molécula de ácido nucleico recombinante.

5 La célula hospedera puede comprender además un ácido nucleico que codifica una molécula de HLA. En una forma de realización, la célula hospedera expresa de manera endógena la molécula de HLA. En otra forma de realización, la célula hospedera expresa la molécula de HLA y/o el ácido nucleico de acuerdo con la invención o una parte del mismo de manera recombinante. La célula hospedera es preferiblemente no proliferativa. En una forma preferida de realización, la célula hospedera es una célula que presenta un antígeno, principalmente una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

10 En otra forma de realización, la invención se refiere a oligonucleótidos que se hibridan con un ácido nucleico identificado de acuerdo con la invención y pueden usarse como sondas genéticas o moléculas "antisentido". Las moléculas de ácido nucleico en la forma de cebadores de oligonucleótidos o muestras competentes que se hibridan con un ácido nucleico identificado de acuerdo con la invención o partes del mismo, pueden usarse para encontrar ácidos nucleicos que son homólogos al ácido nucleico identificado de acuerdo con la invención. La amplificación por PCR, hibridación southern- y northern pueden emplearse para encontrar ácidos nucleicos homólogos. La hibridación
15 puede efectuarse en condiciones poco severas, mejor medio severas y de la mejor manera de altamente severas. El concepto "condiciones severas" se refiere a condiciones de acuerdo con la invención que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a una proteína o polipéptido que se codifican por un ácido nucleico seleccionados del grupo compuesto por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo compuesto por SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, una parte o un derivado del mismo, (b) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con el ácido nucleico de (a), (c) un ácido nucleico que se degenera con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c). En una forma de realización preferida, la invención se refiere a una proteína o a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por SEQ ID NOs: 10,
25 284, 285 y 286 del listado de secuencias, una parte o un derivado de los mismos. En otro aspecto, la invención se refiere a fragmento inmunogénico de un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invención. El fragmento se enlaza preferiblemente a un receptor humano de HLA o un anticuerpo humano. De manera preferible, un fragmento de acuerdo con la invención comprende una secuencia de al menos 6, principalmente de al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 aminoácidos.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un producto que se enlaza a un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invención o una parte del mismo. En una forma preferida de realización, el producto es un anticuerpo. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o preparado con técnicas combinatorias o un fragmento de un anticuerpo. Además, la presente enseñanza técnica se refiere a un anticuerpo que se enlaza selectivamente a un complejo de (i) un antígeno asociado a un tumor, identificado según la invención
35 o una parte del mismo y (ii) una molécula de MHC, al cual se enlaza el antígeno asociado al tumor, identificado según la invención o la parte del mismo, en cuyo caso el anticuerpo no se enlaza solo a (i) o (ii).

Un anticuerpo de acuerdo con la invención 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.

40 Además, la invención se refiere a un conjugado entre un producto de acuerdo con la invención que se enlaza a un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invención, o a una parte del mismo, o un anticuerpo de acuerdo con la invención y un producto terapéutico o diagnóstico. En una forma de realización el producto terapéutico o diagnóstico es una toxina.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para detectar la expresión o la expresión anormal de un antígeno asociado a un tumor, identificado de acuerdo con la invención, que comprende productos para la detección (i) del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor, o de una parte del mismo, (ii) del antígeno asociado a tumor o de una parte del mismo, (iii) de anticuerpos que se enlazan al antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, y/o (iv) de células T que son específicas para un complejo entre el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo y una molécula de MHC. En una forma de realización, los productos para detectar el ácido nucleico o la parte
50 del mismo son moléculas de ácido nucleico para la amplificación selectiva del ácido nucleico que principalmente comprenden una secuencia de 6-50, principalmente 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos continuos del ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención, en el ejemplo 3 se describe un gen o unos productos génicos que se expresan selectivamente en células tumorales o se expresan de modo aberrante y representan antígenos asociados a tumor.

55 De acuerdo con la invención, estos genes o sus derivados son estructuras dianas para enfoques terapéuticos. Como concepto, los enfoques terapéuticos pueden dirigirse a una inhibición de la actividad del producto génico asociado a un tumor expresado selectivamente. Esto es práctico si la expresión selectiva aberrante respectiva tiene importancia

en la patogenética del tumor y su ligadura va acompañada de un daño selectivo de las células correspondientes. Otros conceptos terapéuticos toman en consideración antígenos asociados a tumor como etiquetas que alistan los mecanismos efectores con potencial dañino a la célula de manera selectiva para las células tumorales. En este caso la función de la molécula diana misma y su papel en la aparición del tumor son completamente irrelevantes.

- 5 "Derivado" de un ácido nucleico significa de acuerdo con la invención que en el ácido nucleico están presentes sustituciones, supresiones y/o adiciones simples o múltiples de nucleótidos. Además, el término "derivado" también comprende una derivatización química de un ácido nucleico en una base, un azúcar o un fosfato de un nucleótido. El término "derivado" también comprende ácidos nucleicos que no contienen nucleótidos y análogos de nucleótidos que existen en la naturaleza.
- 10 Un ácido nucleico es, de acuerdo con la invención, preferiblemente ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos comprenden de acuerdo con la invención ADN, ADNc, ARNm genómicos, moléculas sintetizadas químicamente y preparadas de modo recombinante. Un ácido nucleico puede estar presente de acuerdo con la invención como una molécula monocatenaria o bicatenaria y lineal o covalentemente cerrada con forma de círculo.
- 15 Los ácidos nucleicos descritos de acuerdo con la invención están preferiblemente aislados. El término "ácido nucleico aislado" significa de acuerdo con la invención que el ácido nucleico (i) ha sido amplificado in vitro, por ejemplo mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), (ii) ha sido producido de modo recombinante mediante clonación, (iii) ácido purificado, por ejemplo mediante disociación y fraccionamiento por electroforesis en gel, o (iv) ácidos sintetizado mediante síntesis química, por ejemplo. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que se encuentra disponible para una manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.
- 20

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

25

30

De acuerdo con la invención, los ácidos nucleicos complementarios tienen al menos 40%, principalmente al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y de preferencia al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de los nucleótidos.

- 35 Los ácidos nucleicos que codifican antígenos asociados a tumor pueden estar presentes de acuerdo con la invención, solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, principalmente ácidos nucleicos heterólogos. En formas preferidas de realización, un ácido nucleico se enlaza funcionalmente a secuencias de control de expresión o secuencias regulatorias que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico. Una secuencia de codificación y una secuencia regulatoria se encuentran ligadas "funcionalmente" una con otra, en caso que se conecten entre sí de modo covalente de tal manera que la expresión o la transcripción de la secuencia de codificación se encuentre bajo el control o bajo la influencia de la secuencia regulatoria. En caso que la secuencia de codificación de llevar traducirse a una proteína funcional, en caso de un enlace funcional de una secuencia regulatoria con la secuencia de codificación, una inducción de la secuencia regulatoria conduce a una transcripción de la secuencia de codificación sin que ocurran un desplazamiento del marco de lectura en la secuencia de codificación, u ocurran una incapacidad de la secuencia de codificación de traducirse a la proteína o péptido deseados.
- 40
- 45

El término "secuencia de control de expresión" o "secuencia regulatoria" comprende de acuerdo con la invención promotores, enhancers (potenciadores) y otros elementos de control que controlan la expresión de un gen. En determinadas formas de realización según la invención, las secuencias de control de expresión son regulables. La estructura exacta de secuencias regulatorias puede variar dependiendo de la especie o dependiendo del tipo de célula, a que comprende en general secuencias no transcritas 5' y no traducida 5' que participan en la iniciación de la transcripción por la traducción como TATABox, secuencia de capping (cribado), secuencia CAAT y similares. Principalmente, las secuencias de regulación no transcritas 5' comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para un control transcripcional del gen enlazado funcionalmente. Las secuencias regulatorias también pueden comprender secuencias de enhancer o secuencias activadoras colocadas corriente arriba.

50

55

Por lo tanto, por una parte, los antígenos asociados a tumor que se ilustran en la presente pueden combinarse con cualquier secuencia de control de expresión y promotor. Por otra parte, no obstante, los promotores de los productos

genéticos asociados a tumor que se ilustran en la presente pueden combinarse de acuerdo con la invención con otros genes cualesquiera. Esto permite utilizar la actividad selectiva de estos promotores.

5 Además, un ácido nucleico de acuerdo con la invención puede estar presente en unión con otro ácido nucleico que codifica un polipéptido, lo cual controla una secreción de la proteína o del polipéptido codificados por el ácido nucleico desde una célula hospedera. Un ácido nucleico también puede estar presente de acuerdo con la invención en su significado más general y comprende aquellos vehículos intermediarios para un ácido nucleico que hacen posible, por ejemplo, que el ácido nucleico se introduzca en células procariotas y/o eucariotas, y dado el caso se integre a un genoma. Tales vectores se replican y/o se expresan preferiblemente en la célula. Un vehículo intermediario puede adaptarse por ejemplo para el uso en la electroporación, en el bombardeo con micro-proyectiles, en la administración liposomática, en la transferencia con ayuda de agrobacterias o en la inserción por medio de virus de ADN o ARN. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales.

10 En una forma preferida de realización, una molécula de ADN recombinante es de acuerdo con la invención un vector, dado el caso con un promotor que controlan la expresión de un ácido nucleico, por ejemplo un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la invención. El término "vector" se usa en este caso en su significado más general y comprende aquellos vehículos intermediarios para un ácido nucleico que hacen posible, por ejemplo, que el ácido nucleico se introduzca en células procariotas y/o eucariotas, y dado el caso se integre a un genoma. Tales vectores se replican y/o se expresan preferiblemente en la célula. Un vehículo intermediario puede adaptarse por ejemplo para el uso en la electroporación, en el bombardeo con micro-proyectiles, en la administración liposomática, en la transferencia con ayuda de agrobacterias o en la inserción por medio de virus de ADN o ARN. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales.

15 Los ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a tumor, que se identifica de acuerdo con la invención, pueden emplearse para una transfección de células hospederas. Los ácidos nucleicos significan en este caso tanto ADN recombinante como también ARN recombinante. ARN recombinante puede prepararse mediante transcripción in vitro de una matriz de ADN. Además, pueden modificarse mediante secuencias de estabilización, cribado y poliadenilación antes de la aplicación. De acuerdo con la invención, el término "célula hospedera" se refiere a cualquier célula que pueda transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término "célula hospedera" de acuerdo con la invención comprende células procariotas (por ejemplo E. coli) o eucariotas (por ejemplo células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células de levadura y células de insectos). Particularmente se prefieren células de mamíferos tales como células de humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras, primates. Las células pueden derivarse de una multiplicidad de tipos de tejido y comprender células primarias y líneas celulares. Ejemplos específicos comprenden queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de la médula y células madre embrionarias. En otras formas de realización la célula hospedera es una célula representa antígeno, principalmente una célula dendríticas, un monocito o un macrófago. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula hospedera en una única copia o varias copias y se expresa en una forma de realización en la célula hospedera.

20 El término "expresión" se usa de acuerdo con la invención en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína. También comprende una expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede efectuarse de manera transitoria o estable. Los sistemas de expresión preferidos en las células de mamíferos comprenden pcADN3.1 y pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contienen una etiqueta selectiva tal como un gen que confiere resistencia frente a G418 (y por lo tanto hace posible una selección de líneas celulares establemente transfectadas), y las secuencias de potenciadores, promotores de citomegalovirus (CMV).

25 En aquellos casos de la invención en los cuales una molécula de HLA presenta un antígeno asociado a tumor o una parte del mismo, un vector de expresión también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha molécula de HLA. La secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de HLA puede estar presente en el mismo vector de expresión que el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor o la parte del mismo, o ambos ácidos nucleicos pueden estar presentes en diferentes vectores de expresión. En este último caso, los dos vectores de expresión pueden co-transfectarse en una célula. En el caso que una célula hospedera no expresa el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo ni la molécula de HLA, se transfectan a la célula ambos ácidos nucleicos que lo codifican ya sea sobre el mismo vector de expresión o bien sobre diferentes vectores. Si la célula expresa ya la molécula de HLA, la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor o la parte del mismo es transfectada a la célula.

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

35 Moléculas "antisentido" o ácidos nucleicos "antisentido" pueden usarse para regular, principalmente reducir la expresión de un ácido nucleico. El término "molécula antisentido" o "ácido nucleico antisentido" se refiere de acuerdo con la invención a un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido

modificado u oligodesoxirribonucleótido modificado y el cual hibrida en condiciones fisiológicas a ADN, que comprende un gen determinado, o ARNm de este gen, por lo cual se inhibe la transcripción de este gen y/o la traducción de este ARNm. Una "molécula antisentido" también comprende de acuerdo con la invención un constructo, que contiene un ácido nucleico o una parte del mismo en orientación inversa con respecto a su promotor natural. Una transcripción antisentido de un ácido nucleico o de una parte de este puede formar una molécula dúplex con el ARNm que existe naturalmente y que especifica la enzima, y de esta manera puede impedirse una acumulación de o la traducción del ARNm a la enzima activa. Otra posibilidad es el uso de ribozimas para inactivar un ácido nucleico. Los oligonucleótidos antisentido preferidos de acuerdo con la invención tiene una secuencia de 6-50, principalmente de 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos continuos del ácido nucleico diana y preferiblemente son completamente complementarios al ácido nucleico diana o a una parte del mismo.

En formas preferidas de realización, el oligonucleótido antisentido se hibrida con un terminal N o un sitio 5' colocado corriente arriba tal como un sitio de iniciación de traducción, un sitio de iniciación de transcripción o un sitio de promotor. En otras formas de realización, el oligonucleótido antisentido se hibrida con una región 3' no traducida o un sitio de corte y empalme de ARNm.

En una forma de realización, un oligonucleótido de la invención se compone de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o una combinación de los mismos. En este caso, el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido se conectan entre sí mediante un enlace de fósfordiéster. Estos oligonucleótidos pueden sintetizarse de manera convencional o producirse de manera recombinante.

En formas preferidas de realización, un oligonucleótido de acuerdo con la invención es un oligonucleótido "modificado". En este caso, con el fin de incrementar su estabilidad o su efectividad terapéutica, el oligonucleótido puede modificarse de las maneras más diferentes sin que se disminuya su capacidad de enlazarse a su diana. El término "oligonucleótido modificado" significa de acuerdo con la invención un oligonucleótido en el cual (i) al menos dos de sus nucleótidos están conectados entre sí por un enlace sintético internucleósido (es decir un enlace de internucleósido que no es un enlace de fosfodiéster) y/o (ii) un grupo químico, que normalmente no aparece en ácidos nucleicos, está enlazado de modo covalente con el oligonucleótido. Los enlaces de internucleósido sintéticos preferidos son tioatos de fósforo, fosfonato de alquilo, ditioatos de fósforo, ésteres fosfato, fosfonotioatos de alquilo, amidatos de fósforo, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidatos, ésteres de carboximetilo y péptidos.

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

Las proteínas y los polipéptidos descritos de acuerdo con la invención se encuentran preferiblemente aislados. Los términos "proteína aislada" o "polipéptido aislado" significan que la proteína o el polipéptido están separados de su ambiente natural. Una proteína separada o un polipéptido separado pueden estar presentes en un estado esencialmente purificado. El término "esencialmente purificado" significa que la proteína o el polipéptido se encuentran esencialmente libres de otras sustancias con las cuales se asocian en la naturaleza o in vivo.

Tales proteínas y polipéptidos sirven, por ejemplo, para la preparación de anticuerpos y pueden emplearse en un ensayo inmunológico o diagnóstico o como producto terapéutico. Las proteínas y los polipéptidos descritos de acuerdo con la invención pueden aislarse de muestras biológicas como los homogeneizados de tejido o de célula y también pueden expresarse de manera recombinante en una gran cantidad de sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

"Derivados" de una proteína o de un polipéptido o de una secuencia de aminoácido en el sentido de esta invención comprende variantes de inserción de aminoácido, variantes de supresión de aminoácido y/o variantes de sustitución de aminoácido.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden fusiones de terminal amino y/o carboxilo, así como inserciones de un sólo aminoácido o de varios aminoácidos en una secuencia determinada de aminoácidos. En el caso de variantes de secuencias de aminoácido, con una inserción se introduce un residuo de aminoácido o varios residuos de aminoácidos en un sitio predeterminado en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible una inserción aleatoria con cribado adecuado del producto resultante. Las variantes de supresión de aminoácido se caracterizan por la remoción de uno o varios aminoácidos de la secuencia. Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan porque se retira al menos un residuo en la secuencia y se inserta otro residuo en su lugar. De preferencia, las modificaciones se encuentran en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no está conservada entre proteínas o polipéptidos homólogos. Los aminoácidos se reemplazan preferiblemente por otros que tienen propiedades similares tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, electronegatividad, volumen de la cadena lateral, y similares (sustitución conservadora). Las sustituciones conservadoras se refieren por ejemplo al

intercambio de un aminoácido por otro, en cuyo caso ambos aminoácidos se listan en el mismo grupo a continuación:

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

Tres residuos se ponen entre paréntesis debido a su papel particular para la arquitectura de la proteína. Gly es el único residuo sin una cadena lateral por lo tanto confiere flexibilidad a la cadena. Pro tiene una geometría inusual que restringe gran medida la cadena. Cys puede formar un puente de disulfuro.

Las variantes de aminoácidos descritas antes pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas de síntesis de péptido conocidas tales como, por ejemplo, síntesis en fase sólida ("Solid Phase Synthesis") (Merrifield, 1964) y procedimientos similares, o mediante manipulación de ADN recombinante. Las técnicas para introducir mutaciones de sustitución en sitios predeterminados al ADN que tiene una secuencia conocida o parcialmente conocida son bien conocidas y comprenden mutagénesis M13, por ejemplo. La manipulación de las secuencias de ADN para preparar proteínas que tienen sustituciones, inserciones o supresiones se describe detalladamente, por ejemplo, en Sambrook et. al. (1989).

"Derivados" de proteínas o de polipéptidos también comprenden de acuerdo con la invención sustituciones, supresiones y/o adiciones individuales o múltiples, de moléculas cualesquiera que estén asociadas con la enzima, tales como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o polipéptidos. Además, el término "derivado" también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de dichas proteínas o polipéptidos.

De acuerdo con la invención, una parte o fragmento de un antígeno asociado a un tumor tiene una propiedad funcional del polipéptido del cual se ha derivado. Tales propiedades funcionales comprenden la interacción con anticuerpos, la interacción con otros polipéptidos o proteínas, el enlazamiento selectivo de ácidos nucleicos y una actividad enzimática. Una propiedad particular es la capacidad de formar un complejo con HLA y, dado el caso, generar una respuesta inmune. Esta reacción inmune puede basarse en la estimulación de células T citotóxicas o auxiliares. Una parte o un fragmento de un antígeno asociado a un tumor de la invención comprenden preferiblemente una secuencia de al menos 6, principalmente de al menos 8, de al menos 10, de al menos 12, de al menos 15, de al menos 20, de al menos 30 o de al menos 50 aminoácidos continuos del antígeno asociado a un tumor. Una parte o un fragmento del antígeno asociado un tumor es preferiblemente una parte del antígeno asociado a un tumor que corresponde a la porción de no-membrana, principalmente a la fracción extracelular del antígeno o quedan comprendidos por esta.

Una parte o un fragmento de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor se refiere, de acuerdo con la invención, a la parte del ácido nucleico que codifica al menos el antígeno asociado a un tumor y/o a una parte o un fragmento de dicho antígeno asociado un tumor tal como se ha definido antes. Preferiblemente, una parte o un fragmento de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor es aquella parte que corresponde al marco de lectura abierta, principalmente tal como se indica en el listado de secuencias.

El aislamiento y la identificación de genes que codifican antígenos asociados a tumor también hacen posible el diagnóstico de una enfermedad caracterizada por expresión de uno o varios antígenos asociados a tumor. Estos procedimientos 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 a tumor, codificados y/o de péptidos derivados de estos. Los ácidos nucleicos pueden determinarse de la manera convencional, incluso mediante reacción en cadena de polimerasa o hibridación con una sonda etiquetada. La hibridación de antígenos asociados a tumor o de péptidos derivados de estos puede efectuarse mediante un cribado de antisueros de pacientes con respecto de su reconocimiento del antígeno/o de los péptidos. También puede efectuarse mediante un cribado de células T del paciente para especificidad por el correspondiente antígeno asociado a tumor.

La presente invención también hace posible el aislamiento de proteínas que se enlazan a antígenos asociados a tumor, tal como se han descrito aquí, incluidos anticuerpos y contrapartes celulares de enlace de los antígenos asociados a tumor.

La divulgación también se refiere en determinadas formas de realización a polipéptidos "dominantes negativos" que se derivan de antígenos asociados a tumor. Un polipéptido dominante negativo es una variante de proteína inactiva que por medio de la interacción con la maquinaria celular desplaza una proteína activa de su interacción con la maquinaria celular o que compete con la proteína activa por lo cual se reduce el efecto de la proteína activa. Por

ejemplo, un receptor dominante negativo que se enlaza a un ligando aunque no genera ninguna señal en reacción al enlazamiento del ligando, puede reducir el efecto biológico del ligando. De manera similar, una cinasa catalíticamente inactiva, dominante negativa que normalmente interactúa con proteínas dianas, aunque no fosforila las proteínas diana, puede reducir la fosforilación de las proteínas diana en reacción a una señal celular. De manera similar, un factor de transcripción dominante negativo que se enlaza a un sitio de promotor en la región de control de un gen, pero no incrementa la transcripción de dicho gen, puede reducir el efecto de un factor de transcripción normal ocupando sitios de enlazamiento de promotor sin incrementar la transcripción.

El resultado de la expresión de un polipéptido dominante negativo en una célula es una disminución de la función de proteínas activas. El experto en la materia puede preparar variantes dominantes negativas de una proteína, por ejemplo mediante procedimientos convencionales de mutagénesis y mediante evaluación del efecto dominante negativo del polipéptido variante.

En la presente también se divulgan sustancias tales como polipéptidos que se enlazan a antígenos asociados a tumor. Tales sustancias de enlace pueden usarse, por ejemplo, en ensayos de cribado para detectar antígenos asociados a tumor y complejos de antígenos asociados a tumor con sus contrapartes de enlace así como en el caso de una purificación de dichos antígenos asociados a tumor y de complejos de los mismos con sus contrapartes de enlace. Tales sustancias también pueden usarse para inhibir la dignidad de antígenos asociados a tumor, por ejemplo mediante enlace a tales antígenos.

Por lo tanto, la invención también comprende sustancias de enlace tales como, por ejemplo, anticuerpos o fragmento de anticuerpos que son capaces de enlazarse selectivamente a antígenos asociados a tumor. Los anticuerpos comprenden anticuerpos policlonales y monoclonales que se preparan de la manera convencional.

Se sabe que solamente una parte pequeña de una molécula de anticuerpo, el paratopo, participa en el enlazamiento del anticuerpo a su epítipo (cf. Clark, W.R. (1986), *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991), *Essential Immunology*, 7ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc son, por ejemplo, efectores de la cascada complemento aunque no participan en el enlazamiento de antígeno. Un anticuerpo del cual ha sido disociada enzimáticamente la región pFc' o que ha sido preparado sin la región pFc', se denomina fragmento F(ab')₂, lleva ambos sitios de enlazamiento de antígeno de un anticuerpo completo. De manera similar, un anticuerpo del cual ha sido disociada enzimáticamente la región Fc o que ha sido preparado sin la región Fc, se denomina fragmento Fab, lleva un sitio de enlazamiento de antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Además, los fragmentos Fab se componen de una cadena ligera, enlazada de modo covalente de un anticuerpo y una parte de la cadena pesada del anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son los determinantes principales de la especificidad del anticuerpo (un fragmento Fd individual puede asociarse con hasta 10 diferentes cadenas ligeras sin modificar la especificidad del anticuerpo) y, al aislarse, los fragmentos Fd mantienen la capacidad de enlazarse a un epítipo.

Dentro de la parte de un anticuerpo que se enlaza al antígeno se encuentran regiones determinadoras de la complementaridad (CDRs), que interactúan directamente con el epítipo del antígeno, y las regiones marco (FRs) que mantienen la estructura terciaria del paratopo. Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como también en la cadena ligera de IgG-inmunoglobulinas se encuentran cuatro regiones de marco (FR1 a FR4), que están separadas en cada caso por tres regiones de terminadoras de complementaridad (CDR1 a CDR3). Las regiones CDRs y principalmente las regiones CDR3 y todavía más la región CDR3 de la cadena pesada son responsables en gran medida de la especificidad del anticuerpo.

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

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

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

De preferencia, un anticuerpo usado de acuerdo con la invención está dirigido contra una de las secuencias de acuerdo con SEQ ID NOs: 10, 284, 285 y 286 del listado de secuencias, una parte o un derivado de las mismas, principalmente una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 284, 285 o 286 del listado de secuencias y/o puede obtenerse mediante inmunización con estos péptidos.

5 La presente enseñanza técnica también comprende polipéptidos que se enlazan específicamente a antígenos asociados a tumor. Tales sustancias de enlace de polipéptido pueden suministrarse, por ejemplo, mediante bibliotecas de péptido degenerado que pueden prepararse sencillamente en solución en una forma inmovilizada o como bibliotecas indicadoras de fagos. Igualmente pueden prepararse bibliotecas combinatorias de péptidos con uno o varios aminoácidos. Además, pueden prepararse bibliotecas de peptoides y residuos sintéticos no peptídicos.

10 El indicador de fagos puede ser particularmente efectivo al identificar péptidos de enlazamiento de la invención. En esta conexión, por ejemplo, se preparan una biblioteca de fagos (usando, por ejemplo, los fagos m13, fd o lambda) que presenta insertos de una longitud de 4 a aproximadamente 80 residuos de aminoácidos. Se seleccionan luego fagos que tienen insertos que se enlazan al antígeno asociado a un tumor. Este proceso puede repetirse por varios ciclos de una reelección de fagos que se enlazan al antígeno asociado a un tumor. Las rondas repetidas conducen a un enriquecimiento de fagos que llevan determinadas secuencias. Puede efectuarse un análisis de secuencias de ADN a fin de identificar las secuencias de los polipéptidos expresados. Puede determinarse la porción lineal más pequeña de la secuencia que se enlaza al antígeno asociado a un tumor. El "sistema two-hybrid" (de dos híbridos) de levadura también puede usarse para identificar polipéptidos que se enlazan a un antígeno asociado a un tumor. Los antígenos asociados a tumor que se describen de acuerdo con la invención, o fragmentos de los mismos, pueden usarse para cribar bibliotecas de péptidos que incluyen bibliotecas de indicadores de fagos con el fin de identificar y seleccionar contrapartes de enlace de péptidos de los antígenos asociados a tumor. Tales moléculas pueden usarse, por ejemplo, para ensayos de cribado, protocolos de purificación, para una interferencia con la función del antígeno asociado a un tumor y para otros propósitos conocidos por el especialista.

15 Los anticuerpos y otras moléculas de enlazamiento descritos antes pueden usarse, por ejemplo, para identificar tejido que expresa un antígeno asociado a un tumor. Los anticuerpos también pueden acoplarse a sustancias diagnósticas específicas para indicar células y tejidos que expresan antígenos asociados a tumor. También pueden acoplarse a sustancias terapéuticamente útiles. Las sustancias diagnósticas comprenden de una manera no limitante sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y sustancias radio-diagnósticas incluidos emisores de positrón tales como flúor-18 y carbono-11, emisores gamma tales como yodo-123, tecnecio-99m, yodo-131 e indio-111, nuclidos para resonancia magnética nuclear como flúor y gadolinio. De acuerdo con la invención, el término "sustancia terapéuticamente útil" significa cualquier molécula terapéutica de acuerdo con la invención que en la medida que se desea es guiada a una célula que expresa uno o varios antígenos asociados a tumor, incluidos productos anticancerosos, compuestos provistos de yodo radioactivo, toxinas, medicamentos citostáticos o citolíticos, etc. Los productos anticancerosos comprenden, por ejemplo, aminoglutetimida, azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfano, carmustina, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabina, dacarbazina, dactinomina, daunorubina, doxorubicina, taxol, etoposid, fluoruracilo, interferón- α , lomustina, mercaptopurina, metotrexat, mitotano, procarbazona-HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina. Otros productos anticancerosos se describen, por ejemplo, en Goodman y Gilman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 8ª edición, 1990, McGraw-Hill, Inc., principalmente capítulo 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner)). Las toxinas pueden ser proteínas tales como proteína antiviral de pokeweed (hierba carmín), coleratoxina, pertussistoxina, ricino, gelonina, abrina, exotoxina de difteria o exotoxina de pseudomonas. Los residuos de toxina también pueden ser radionúclidos de emisión de alta energía tales como cobalto-60.

25 El término "paciente" significa de acuerdo con la invención un ser humano, un primate no humano u otro animal, principalmente un mamífero como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perro, gato o un roedor como ratón y rata. En una forma particularmente preferida de realización el paciente es un ser humano.

30 El término "enfermedad" de acuerdo con la invención se refiere a cada Estado patológico en el cual se expresan o se expresan anormalmente antígenos asociados a tumor. "Expresión anormal" de acuerdo con la invención significa que la expresión cambia, preferiblemente se incrementa comparado con el estado en un individuo sano. Un incremento en la expresión se refiere a un incremento en al menos 10%, principalmente en al menos 20%, al menos 50% o al menos 100%. En una forma de realización el antígeno asociado a un tumor se expresa solamente en tejidos de un individuo enfermo, mientras que la expresión en un individuo sano es reprimida. Un ejemplo de una enfermedad de este tipo es cáncer, principalmente seminomas, melanomas, teratomas, gliomas, cáncer de colon, rectal, de riñones, de mama, de próstata, de útero, de ovarios, de endometrio, de esófago, de hígado, de páncreas, de piel, de cerebro y de pulmones, linfomas y neuroblastomas. Ejemplos de estos son tumores en pulmones, mama, próstata, colon, carcinoma de células renales, de cervix, de colon y de mama, o metástasis o tumores de los tipos de cáncer anteriores.

De acuerdo con la invención, una muestra biológica puede ser una muestra de tejido y/o una muestra celular puede obtenerse de la manera convencional mediante biopsia tisular, incluida biopsia por punzonado, tomando sangre,

aspirado bronquial, orina, heces u otros fluidos corporales, para uso en los diversos procedimientos descritos en la presente.

El término "célula inmunoreactiva" significa de acuerdo con la invención una célula que puede madurar en una célula inmune (tal como una célula B, una célula T auxiliar o una célula T citolítica) con estimulación adecuada. Las células Immunogen las comprenden células madres hematopoyéticas CD34+, células T inmaduras y maduras y células B inmaduras y maduras. Si se desea la producción de células T citolíticas o auxiliares que reconocen un antígeno asociado a un tumor, la célula inmunoreactiva se pone en contacto con una célula que expresa un antígeno asociado a un tumor en condiciones que favorecen la producción, diferenciación y/o selección de células T citolíticas y auxiliares. La diferenciación de precursores de célula T en una célula T citolítica durante una exposición a un antígeno es similar a la selección clonal del sistema inmune.

Algunos procedimientos terapéuticos se basan en una reacción del sistema inmune de un paciente lo cual conduce a una lisis de células que presentan antígeno, como células cancerosas, que presentan uno o varios antígenos asociados a tumor. En este caso, por ejemplo los linfocitos T citotóxicos autólogos que son específicos para un complejo de un antígeno asociado a un tumor y una molécula de MHC, se administran a un paciente con anomalías celular. Se conoce la producción de tales linfocitos T citotóxicos in vitro. Un ejemplo de un procedimiento para diferenciar células T se encuentra en la publicación WO-A-96/33265. En términos generales, se retira una muestra con células, tales como células sanguíneas, del paciente y las células se ponen en contacto con una célula que presenta el complejo y puede causarse la propagación de linfocitos T citotóxicos (por ejemplo células dendríticas). La célula siana puede ser una célula transfectadas tal como una célula COS. Estas células transfectadas presentan el complejo deseado sobre su superficie y estimulan su propagación al ponerse en contacto con linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos autólogos expandidos clonalmente se administran luego al paciente.

En caso de otro procedimiento para seleccionar linfocitos T citotóxicos específicos para el antígeno, se usan tetrámeros fluorogénicos de complejos de moléculas clase I-MHC/péptido para detectar clones específicos de linfocitos T citotóxicos (Altman et al., Science 274:94-96, 1996; Dunbar et al., Curr. Biol. 8:413-416, 1998). Las moléculas solubles de clase I-MHC se pliegan in vitro en presencia de β 2-microglobulina y un antígeno-péptido que se enlaza a la molécula de clase I. Después de purificar los complejos MHC/péptido, éstos son etiquetados con biotina. Los tetrámeros se forman mezclando los complejos biotinilados de péptido-MHC con avidina etiquetada (por ejemplo ficoeritrina) a una proporción molar de 4:1. Los tetrámeros se ponen en contacto luego con linfocitos T citotóxicos como sangre periférica o NO2 linfáticos. Los tetrámeros se enlazan a linfocitos T citotóxicos que reconocen el complejo péptido-antígeno/MHC- clase I. Las células a las cuales se enlazan los tetrámeros pueden clasificarse mediante clasificación celular controlada por fluorescencia para un aislamiento de linfocitos T citotóxicos reactivos. Los linfocitos T citotóxicos aislados pueden propagarse luego in vitro.

En un procedimiento terapéutico, que se denomina transferencia adoptiva (Greenberg, J. Immunol. 136(5):1917, 1986; Riddel et al., Science 257:238, 1992; Lynch et al., Eur. J. Immunol. 21:1403-1410, 1991; Kast et al., Cell 59:603-614, 1989), las células que presentan el complejo deseado (por ejemplo células dendríticas) se combinan con linfocitos T citotóxicos del paciente que va a tratarse, lo que conduce a una propagación de linfocitos T citotóxicos específicos. Los linfocitos T citotóxicos propagados se administran luego a un paciente que tiene una anomalía celular caracterizada por determinadas células anormales que presentan el complejo específico. Los linfocitos T citotóxicos lisan luego las células anormales por lo cual se logra un efecto terapéutico deseado.

Con frecuencia, del repertorio de células T de un paciente, solamente pueden propagarse las células T con baja afinidad frente a un complejo específico de este tipo, puesto que aquellas con alta afinidad han sido extinguidas debido al desarrollo de tolerancia. Una alternativa aquí puede ser una transferencia del mismo receptor de células T. Para esto también se combinan células que presentan el complejo deseado (por ejemplo células dendríticas) con linfocitos T citotóxicos de individuos sanos. Esto da lugar a una propagación de linfocitos T citotóxicos específicos con alta afinidad si el donante no ha tenido contacto previo con el complejo específico. El receptor de célula T de alta afinidad de estos linfocitos T específicos propagados es clonado y puede transducirse a discreción por medio de transferencia de genes usando, por ejemplo, vectores retrovirales a células T de otros pacientes. Luego se efectúa la transferencia adoptiva con estos linfocitos T genéticamente modificados (Stanislawski et al., Nat. Immunol. 2:962-70, 2001; Kessels et al., Nat. Immunol. 2:957-61, 2001).

Los aspectos terapéuticos anteriores parten del hecho de que al menos algunas de las células anormales del paciente presentan un complejo de un antígeno asociado a un tumor y una molécula de HLA. Tales células pueden identificarse de una manera conocida per se. Tan pronto las células que presentan el complejo han sido identificadas, pueden combinarse con una muestra del paciente la cual contiene linfocitos T citotóxicos. Si los linfocitos T citotóxicos lisan las células que presentan el complejo, puede suponerse que se presenta un antígeno asociado a un tumor.

La transferencia adoptiva no es la única forma de terapia que puede aplicarse de acuerdo con la invención. Los linfocitos T citotóxicos también pueden generarse in vivo de una manera conocida per se. En un procedimiento se usan células no proliferativas que expresan el complejo. Las células usadas aquí serán aquellas que normalmente expresan el complejo, tales como células tumorales irradiadas o células que han sido transfectadas con uno o

ambos genes que son necesarios para una presentación del complejo (es decir, el péptido-antígeno y la molécula de HLA que presentadora). Pueden usarse diversos tipos de célula. Además, es posible usar vectores que lleven uno o ambos genes de interés. Se da preferencia particular a vectores virales o bacterianos. Por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor o una parte del mismo pueden conectarse funcionalmente con secuencias de promotor y de enhancer que controlan una expresión del antígeno asociado a tumor o un fragmento del mismo en tejidos o tipos de células particulares. El ácido nucleico puede incorporarse a un vector de expresión. Los vectores de expresión pueden ser ácidos nucleicos extracromosómicos no modificados, plásmidos o genomas virales en los cuales pueden insertarse ácidos nucleicos exógenos. Los ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor también pueden insertarse a un genoma retroviral, por lo cual se permite que el ácido nucleico se integre al genoma del tejido diana o la célula diana. En estos sistemas, un microorganismo tal como un virus vacuna, poxvirus, virus de herpes simplex, retrovirus o adenovirus lleva el gen de interés e "infecta" de facto las células hospederas. Otra forma preferida es la introducción del antígeno asociado a un tumor en forma de ARN recombinante que puede introducirse las células mediante transferencia liposómica o mediante electroporación, por ejemplo. Las células resultantes presentan el complejo de interés y son reconocidas por linfocitos T citotóxicos autólogos que luego se propagan.

Un efecto similar puede lograrse mediante combinación del antígeno asociado a tumor o de un fragmento del mismo con un adyuvante con el fin de hacer posible la incorporación in vivo a células que presentan antígeno. El antígeno asociado a un tumor o un fragmento del mismo pueden representarse como proteína, como ADN (por ejemplo dentro de un vector) o como ARN. El antígeno asociado tumor es tratado para producir un péptido-contraparte para la molécula de HLA, mientras que un fragmento del mismo puede presentarse sin la necesidad de más tratamiento. Este último es el caso en particular si estos pueden enlazarse a moléculas de HLA. Se prefieren formas de administración en las cuales el antígeno completo sea tratado in vivo por una célula dendrítica, puesto que aquí también pueden generarse respuestas de células T auxiliares. Una respuesta inmune efectiva necesita de estas (Ossendorp et al., *Immunol. Lett.* 74:75-9, 2000; Ossendorp et al., *J. Exp. Med.* 187:693-702, 1998). En términos generales, una cantidad efectiva del antígeno asociado a un tumor puede administrarse a un paciente mediante una inyección intradérmica, por ejemplo. Pero la inyección también puede efectuarse a nivel intranodal en un nodo linfático (Maloy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3299-303, 2001). También puede efectuarse en combinación con reactivos que facilitan la asimilación en las células dendríticas. Antígenos asociados a tumor que son preferidos comprenden aquellos que reaccionan con antiseros de cáncer alogénicos o con células T de muchos pacientes con cáncer. Pero también son de interés particular aquellos contra los que no existen previamente respuestas inmunes espontáneas. Contra estos pueden inducirse de manera evidente respuestas inmunes 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 de acuerdo con la invención también pueden usarse como vacunas para inmunización. Los términos "inmunización" o "vacunación" significan de acuerdo con la invención un incremento o una activación de una respuesta inmune a un antígeno. Es posible usar modelos animales para ensayar un efecto inmunizante en cáncer usando un antígeno asociado a un tumor o un ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, pueden introducirse células cancerosas humanas a un ratón para generar un tumor y pueden administrarse uno o más ácidos nucleicos que codifican antígenos asociados a tumor. El efecto en las células cancerosas (por ejemplo reducción en el tamaño del tumor) puede medirse como una medida de la efectividad de una inmunización por el ácido nucleico.

Como parte de la composición para una inmunización se administran uno o más antígenos asociados a tumor o fragmentos estimulantes de los mismos conjuntamente con uno o más adyuvantes para inducir una respuesta inmune o para incrementar una respuesta inmune. Un adyuvante es una sustancia que se incorpora al antígeno o se administran junto con este y que intensifica la respuesta inmune. Los adyuvantes pueden intensificar la respuesta inmune proporcionando un reservorio de antígeno (a nivel extracelular o en macrófagos), activando macrófagos y estimulando determinados linfocitos. Los adyuvantes son conocidos e comprenden de una manera no limitante monofosforilo-lípido-A (MPL, SmithKline Beecham), Saponine wie QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 y QS-L1 (So et al., *Mol. Cells* 7:178-186, 1997), adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, vitamina E, montanida, alumbre, CpG-oligonucleótidos (cf. Krieg et al., *Nature* 374:546-9, 1995) y diferentes emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites biodegradables tales como escualeno y/o tocoferol. Los péptidos se administran preferiblemente en una mezcla con DQS21/MPL. La proporción de DQS21 a MPL típicamente es de aproximadamente 1:10 a 10:1, preferiblemente alrededor de 1:5 a 5:1 y principalmente alrededor de 1:1. Para una administración a un ser humano, una formulación de vacuna contiene de manera típica DQS21 y MPL en un intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg.

También pueden administrarse otras sustancias que estimulan una respuesta inmune del paciente. Por ejemplo pueden usarse citocinas en una vacunación debido a sus propiedades regulatorias en linfocitos. Tales citocinas comprenden, por ejemplo, interleucina-12 (IL-12), de la cual se ha mostrado que intensifica los efectos protectores de las vacunas (cf. *Science* 268:1432-1434, 1995), GM-CSF y IL-18.

Hay una serie de compuestos que intensifican una respuesta inmune y, por lo tanto, que pueden ser usados en una vacunación. Estos comprenden moléculas co-estimulantes que se proporcionan en forma de proteínas o ácidos

nucleicos. Tales moléculas co-estimulantes son, por ejemplo, B7-1 y B7-2 (CD80 bzw. CD86), que se expresan sobre células dendríticas (DC) e interactúan con la molécula CD28 expresada en las células T. Esta interacción proporciona una co-estimulación (señal 2) para una célula T estimuladas con antígeno/MHC/TCR (señal 1), por lo cual se intensifica la propagación de las células B y la función efectora. B7 también interactúa con CTLA4 (CD152) sobre células T y los estudios que incluyen ligandos CTLA4 y B7 muestran que la interacción de B7-CTLA4 puede intensificar una inmunidad antitumoral y una propagación de CTL (Zheng, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(11):6284-6289 (1998)).

De manera típica, B7 no se expresa en células tumorales de modo que estas no son células efectivas que presenten antígeno (APCs) para células T. Una inducción de la expresión de B7 permitiría que las células tumorales estimularan de modo más efectivo la propagación de linfocitos T citotóxicos y una función efectora. Una coestimulación mediante una combinación de B7/IL-6/IL-12 mostró una inducción del perfil IFN-gamma y Th1-citocina en una población de células T, lo cual conduce a una actividad adicional intensificada de células T (Gajewski et al., J. Immunol. 154:5637-5648 (1995)).

Una activación completa de linfocitos T citotóxicos y una función efectora completa requiere una participación de células T auxiliares mediante la interacción entre los ligandos CD40 sobre las células T auxiliares y la molécula de CD40 que es expresada por células dendríticas (Ridge et al., Nature 393:474 (1998), Bennett et al., Nature 393:478 (1998), Schönberger et al., Nature 393:480 (1998)). El mecanismo de esta señal coestimulante se refiere probablemente al incremento de la producción de B7 y de IL-6/IL-12 asociado por las células dendríticas (células que presentan antígeno). La interacción de CD40-CD40L complementa de esta manera las interacciones de la señal 1 (antígeno/MHCTCR) y de la señal 2 (B7-CD28).

El uso de anticuerpos anti-CD40 para una estimulación de células dendríticas intensificaría según las expectativas directamente una reacción frente a los antígenos tumorales que se encuentran normalmente por fuera de la región de una reacción inflamatoria o que se presentan por células no profesionales que presentan antígeno (células tumorales). En estas situaciones no se proporcionan señales coestimulantes de auxiliares T y B7. Este mecanismo podría usarse en conexión con terapias que se basan en células dendríticas pulsadas por antígeno o en situaciones en las cuales no se han definido epítomos de auxiliar T en precursores conocidos de TRA.

De acuerdo con la invención también se proporciona una administración de ácidos nucleicos, polipéptidos o péptidos. Una administración de polipéptidos y péptidos puede efectuarse de manera conocida. En una forma de realización, la administración de ácidos nucleicos se efectúa mediante procedimientos ex vivo, es decir retirando células de un paciente, modificando genéticamente las células con el fin de incorporar un antígeno asociado a un tumor y reintroduciendo las células modificadas al paciente. Esto comprende en términos generales la introducción de una copia funcional de un gen a la célula de un paciente in vitro y la reintroducción de las células genéticamente modificadas al paciente. La copia funcional del gen se encuentra bajo control funcional de elementos regulatorios que permiten que el gen se exprese en las células genéticamente modificadas. Los procedimientos de transfección y transducción son conocidos por el experto en la materia. De acuerdo con la invención se proporciona también una administración de ácidos nucleicos in vivo usando vectores como virus y liposomas controlados de manera dirigida.

En una forma de realización preferida, un vector viral para administrar un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado un tumor se selecciona del grupo compuesto por adenovirus, virus adeno-asociados, poxvirus, incluidos virus de vacuna y poxvirus atenuados, virus Semliki-Forest, retrovirus, virus Sindbis y partículas similares a virus Ty. Particularmente se prefieren adenovirus y retrovirus. Los virus habitualmente son deficientes en replicación (es decir que son incapaces de generar partículas infecciosas).

Pueden emplearse diferentes procedimientos con el fin de introducir ácidos nucleicos de acuerdo con la invención a células in vitro o in vivo. Tales procedimientos comprenden la transfección de precipitados de ácido nucleico-fosfato de calcio, la transfección de ácidos nucleicos que están asociados con DEAE, la transfección o infección con los virus anteriores que llevan los ácidos nucleicos de interés, la transfección mediada por liposomas y similares. En determinadas formas de realización se prefiere un control del ácido nucleico en células determinadas. En tales formas de realización, un soporte que se emplea para administrar un ácido nucleico a una célula (por ejemplo un retrovirus o un liposoma) puede tener una molécula enlazada de control diana. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo que es específico para una proteína de membrana superficial sobre una célula diana o un ligando para un receptor en la célula diana puede incorporarse o adherirse al soporte de ácido nucleico. Anticuerpos preferidos comprenden anticuerpos que se enlaza selectivamente a un antígeno asociado al tumor. Si se desea la administración de un ácido nucleico a través del liposomas, a la formulación de liposoma pueden incorporarse proteínas que se enlazan a una proteína de membrana superficial asociada con endocitosis con el fin de hacer posible el control diana y/o la asimilación. Tales proteínas comprenden proteína de capsida o fragmentos de la misma que son específicos para un tipo de célula determinado, anticuerpos contra proteínas que son internalizadas, proteínas que se dirigen a un sitio intracelular, y similares.

Las composiciones terapéuticas de la invención deben administrarse en preparaciones farmacéuticamente compatibles. Tales preparaciones pueden contener habitualmente concentraciones farmacéuticamente compatibles de sales, sustancias reguladoras de pH, conservantes, vehículos, sustancias complementarias que incrementan la

inmunidad tales como adyuvantes (por ejemplo CpG-oligonucleótidos) y citocinas y, dado el caso, otras sustancias activas terapéuticas.

5 La sustancias activas terapéuticas según la invención pueden administrarse mediante cualquier vía convencional, incluidas inyección o infusión. La administración puede efectuarse, por ejemplo, por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o transdérmica. Los anticuerpos se administran terapéuticamente de preferencia por medio de un aerosol pulmonar. Los ácidos nucleicos antisentido se administran preferiblemente mediante administración intravenosa lenta.

10 Las composiciones de acuerdo con la invención se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o conjuntamente con dosis adicionales. En caso de tratamiento de una enfermedad determinada o de una condición determinada, que se caracteriza por la expresión de uno o varios antígenos asociados a tumor, la reacción deseada se refiere a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y principalmente interrumpir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una condición también puede ser retrasar el inicio o prevenir el inicio de la enfermedad o la condición.

15 Una cantidad efectiva de una composición de la invención dependerá de la condición que va a tratarse, la severidad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente que incluyen edad, condición fisiológica, tamaño y peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia acompañante (si se presenta), la ruta específica de administración y factores similares.

20 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son preferiblemente estériles y contienen una cantidad efectiva de la sustancia terapéuticamente efectiva para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

Las dosis de las composiciones de acuerdo con la invención que se administran pueden depender de diferentes parámetros como el tipo de administración, la condición del paciente, el tiempo deseado de administración, etc. Para el caso en que una reacción sea insuficiente en un paciente en el caso de una dosis inicial, pueden usarse dosis más altas (o dosis efectivamente más altas que se logran mediante otra ruta de administración más localizada).

25 En términos generales se formulan dosis del antígeno asociado a un tumor desde 1 ng hasta 1 mg, preferiblemente desde 10 ng hasta 100 µg, y se administran para un tratamiento o para generar o incrementar una respuesta inmune. Si se desea la administración de ácidos nucleicos (ADN y ARN) que codifican antígenos asociados a tumor, se formulan y administran dosis desde 1 ng hasta 0,1 mg.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente se administran en cantidades farmacéuticamente compatibles y en composiciones farmacéuticamente compatibles. El término "farmacéuticamente compatible" se refiere a un material no tóxico que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica. Las preparaciones de este tipo pueden contener habitualmente sales, sustancias reguladoras de pH, sustancias conservantes, vehículos y, dado el caso, otras sustancias activas terapéuticas. En caso de usar en el en la, las sales deben ser farmacéuticamente compatibles. Sin embargo, pueden usarse sales que no son farmacéuticamente compatibles para la preparación de sales farmacéuticamente compatibles y están comprendidas de acuerdo con la invención. Tales sales farmacológicamente y farmacéuticamente compatibles comprenden, de una manera no limitante, aquellas que se preparan a partir de los siguientes ácidos: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido maleico, ácido acético, ácido salicílico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido malónico, ácido succínico y similares. Sales farmacéuticamente compatibles también pueden prepararse como sales de metal alcalino o sales de metal alcalinotérreo tales como sales de sodio, de potasio o de calcio.

45 Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender un vehículo farmacéuticamente compatible. El término "vehículo farmacéuticamente compatible" se refiere de acuerdo con la invención a uno o a varios materiales de carga que son compatibles, sólidos o líquidos, a diluyentes o a sustancias de cápsula que son adecuados para una administración a un ser humano. El término "vehículo" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético, en el cual se combina el componente activo con el fin de facilitar una aplicación. Los componentes de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención son habitualmente de tal manera que no ocurra una interacción que perjudique esencialmente la efectividad farmacéutica deseada.

50 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden contener sustancias reguladoras de pH adecuadas tales como ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, dado el caso, sustancias conservantes adecuadas como cloruro de benzalconio, clorbutanol, parabenos y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas habitualmente se presentan en una forma posológica unitaria y pueden prepararse de manera conocida per se. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires o como emulsión.

5 Las composiciones que son adecuadas para una composición parenteral habitualmente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo la cual es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Ejemplos de vehículos y disolventes compatibles son solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Adicionalmente, como medio de solución o de suspensión usualmente se usan aceites estériles, fijados.

10 La presente invención se describe detalladamente por medio de las figuras más adelante que sirven exclusivamente para propósitos de ilustración y no deben entenderse como limitantes. Debido a la descripción y a los ejemplos, otras formas de realización son accesibles para el especialista.

Figuras:

Fig.1: Análisis mediante qPCR de LOC203413

15 Análisis cuantitativo de expresión de LOC203413 en tejidos sanos (izquierda) y en muestras de tumores (combinaciones que se componen respectivamente de 3-5 muestras individuales, derecha). A Representación logarítmicas de la expresión (activación múltiple). B Resultado después de fraccionamiento por medio de electroforesis en gel.

Fig. 2: Análisis detallado de la expresión específica de LOC203413 en carcinomas gástricos

20 Análisis cuantitativo de expresión de LOC203413 en diferentes muestras de tumores de estómago (n=10) en comparación con la expresión en estómago sano (n=6). A Representación lineal de la expresión relativa. B Imagen después del fraccionamiento por medio de electroforesis en gel de los amplificadas

Ejemplos:

Materiales y métodos

Los términos "in silico", y "electrónico" se refieren solamente a la utilización de métodos con base en base de datos que también pueden usarse para simular operaciones experimentales de laboratorio.

25 Si no se define explícitamente algo diferente, todos los otros términos y expresiones se usan tal como los entiende el especialista. Las técnicas y procedimientos mencionados se efectúan de manera conocida per se y se encuentran descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. todos los procedimientos que incluyen el uso de kits y reactivos se efectúan de acuerdo con los datos del fabricante.

30 Ejemplo 1:

Estrategia con base en minería de datos para identificar antígenos asociados a tumor

35 De acuerdo con la invención fueron cribadas bases de datos públicas de proteína y de ácido nucleico con respecto a antígenos específicos de cáncer que son accesibles en la superficie celular. La definición de los criterios de filtro necesarios para esto, junto una metodología de alto rendimiento para el análisis en lo posible de todas las proteínas, formaron el componente central de esta estrategia.

40 El punto de partida consistió en genes potenciales predichos principalmente por el proyecto de genoma humano que ha sido depositado como entradas únicamente ejemplares de proteína (XP) o de ARNm (XM) en la base de datos "RefSeq" (Pruitt et al., Trends Genet. enero;16(1):44-47, 2000) del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI). En otro enfoque, las entradas validadas de proteína (NP) y, respectivamente los correspondientes ARNms (NM) de la misma base de datos también se analizaron de la misma manera. Siguiendo el principio fundamental de gen (hipotético) a ARNm a proteína, primero se estudiaron las proteínas para la presencia de dominios de transmembrana combinando una cantidad de programas de predicción para análisis de proteína. De la fracción XP humana de la base de datos "RefSeq" se analizaron en total 19.544 entradas, en cuyo caso 2.025 proteínas hipotéticas satisficieron los criterios de filtro. La fracción NP humana proporcionó un total de 19.110 entradas con una fracción de 4.634 proteínas filtradas.

45 El ARNm correspondiente de cada una de estas 2.025 y, respectivamente, 4.634 proteínas fue sometida luego a una búsqueda de homología en la base de datos EST (Boguski et al., Nat. Genet. 4(4):332-333, 1993) del NCBI con la ayuda del algoritmo "BLAST" (Altschul et al., Nucleic Acids Res.25:3389-3402, 1997). Los criterios de filtro se establecieron en el caso de esta búsqueda como severos. Un total de 1270 ARNms hipotéticos lograron en este

caso al menos un acierto en la base de datos EST, en cuyo caso la cantidad de los aciertos en los casos individuales fue más de 1000.

5 A continuación, el origen específico del tejido de la biblioteca de ADNc fundamental, así como el nombre de la biblioteca, fueron determinados para cada uno de estos aciertos. Los tejidos que resultaron de esto se dividieron en cuatro grupos diferentes que iban desde órganos dispensables (grupo 3) hasta órganos absolutamente esenciales (grupos 0). Otro grupo, el grupo 4, fue formado por todas las muestras que habían sido obtenidas de tejido canceroso. La distribución de aciertos en los cinco grupos fue registrada en una tabla que se clasificó de acuerdo con la mejor proporción de la suma de los grupos 3 y 4 frente a la suma de los grupos 0-2. En tal caso, aquellos ARNm cuyos aciertos de EST provenían exclusivamente de tejido canceroso alcanzaron una posición en la cima, seguidos por aquellos que pueden encontrarse adicionalmente también en tejidos de órganos dispensables del grupo 3.

15 Puesto que las transcripciones determinadas en la primera estrategia y las proteínas correspondientes son primero constructos hipotéticos, se usaron otros criterios de filtro con la intención de probar la existencia real de los ARNm y por consiguiente también de las proteínas. Para este propósito, cada ARNm fue comparado con el locus génico predicho. Sólo aquellas transcripciones que tienen al menos un proceso de corte y empalme, es decir que se distribuyen sobre al menos 2 exones, fueron usados para análisis más extensos.

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

Ejemplo 2:

Estrategia de validación de los antígenos asociados a tumor, identificados por medio de análisis in silico

25 Para utilizar las dianas para propósitos inmunoterapéuticos (terapia anticuerpo por medio de anticuerpos monoclonales, vacunación, estrategias terapéuticas mediadas por receptor de célula T; cf. EP-B-0 879 282) u otras estrategias direccionadas a una diana (compuestos pequeños, ARNsi, etc.) en la terapia cancerosa, así como también para problemas diagnósticos, la validación de las dianas identificadas de acuerdo con la invención es de importancia central. En este caso la validación se efectúa mediante análisis de expresión a niveles tanto de ARN como también de proteína.

1. Estudio de la expresión de ARN

30 La primera validación de los antígenos tumorales identificados se efectúa con ayuda de ARN que se ha obtenido de diferentes tejidos o de líneas celulares específicas para un tejido. Debido a que el patrón de expresión diferencial de tejido sano en comparación con tejido tumoral tiene una importancia decisiva para la aplicación terapéutica más tarde, la caracterización de los genes diana se efectúa preferiblemente con ayuda de estas muestras de tejido.

35 El aislamiento de ARN total de las muestras de tejido nativo o de líneas celulares tumorales se efectúa con procedimientos que están estandarizados en la biología molecular. Por ejemplo, el aislamiento puede efectuarse con ayuda del kit RNeasy Maxi (Qiagen, No. de cat. 75162) de acuerdo con la instrucción del fabricante. Éste procedimiento de aislamiento se basa en el uso de isotiocianato de guanidinio como reactivo caotrópico. De manera alternativa, el aislamiento puede realizarse con fenol ácido (Chomczynski & Sacchi, Anal. Biochem. 162: 156-159, 1987). Después que se ha tratado el tejido por medio de isotiocianato de guanidinio, el ARN se extrae con fenol ácido y a continuación se precipita con isopropanol y se lleva a agua tratada con DEPC.

40 2-4 µg del ARN aislado de esta manera se transcriben a continuación a ADNc, por ejemplo por medio del Superscript II (Invitrogen) de manera correspondiente al protocolo del fabricante. El imprimado de la síntesis de ADNc se efectúa en este caso con ayuda de hexámeros aleatorios (por ejemplo Roche Diagnostics) de acuerdo con protocolos estándar del fabricante respectivo. Para control de calidad se amplifican los ADNcs con cebadores en 30 ciclos, usando cebadores específicos para el gen p53 que se expresa solamente muy poco. Solamente muestras de ADNc positivo p53 se usarán para los otros pasos de reacción.

45 Para análisis detallado de la diana, se realiza a base de un archivo de ADNc que ha sido aislado a partir de tejidos normales y tumorales así como de líneas celulares tumorales, un análisis de expresión por medio de PCR o de PCR cuantitativo (qPCR). Para este propósito se amplifican 0,5 µl de ADNc de la mezcla anterior con una polimerasa de ADN (por ejemplo 1 U de polimerasa de ADN HotStarTaq, Qiagen) de manera análoga a los protocolos del respectivo fabricante (volumen total de la mezcla: 25-50 µl). Además de la polimerasa, la mezcla de amplificación contiene 0,3 mM de dNTPs, regulador de pH de reacción (concentración final 1 x, dependiendo del fabricante de la polimerasa de ADN) y en cada caso 0,3 mM del forward específico del gen y cebadores inversos.

Los cebadores específicos del gen diana son, en tanto sea posible, seleccionados de tal manera que se encuentran localizados en dos secciones diferentes para que las contaminaciones genómica as no conduzcan a resultados falsos positivos. En una PCR de punto final no cuantitativa, el ADNc es incubado típicamente a 95 °C por 15 minutos con el fin de desnaturalizar el ADN y activar la enzima Hot-Start. A continuación se amplifica el ADN en 35 ciclos (1 min 95°C, 1 min a la temperatura de hibridación específica del cebador (aproximadamente 55-65 °C), 1 min 72°C para elongación de los amplicones). A continuación, se aplicaron 10 µl de la mezcla de PCR a geles de agarosa y se fraccionaron en el campo eléctrico. El ADN se hizo visible en los geles tinturando con bromuro de etidio y el resultado de PCR se documenta por medio de una fotografía.

Como una alternativa a la PCR convencional, también puede analizarse la expresión de un gen diana mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Mientras que para este análisis se encuentran disponibles diversos sistemas analíticos, de los cuales los mejores conocidos son el sistema de detección de secuencia ABI PRISM (TaqMan, Applied Biosystems), el iCycler (Biorad) así como el Light cycler (Roche Diagnostics). Tal como se ha descrito antes, una mezcla de PCR específicas se somete a una corrida en los instrumentos en tiempo real. Adicionando un tinte de intercalación de ADN (por ejemplo, bromuro de etidio, CybrGreen) se hace visible el ADN recién sintetizado mediante excitación específica de luz (de acuerdo con la información del fabricante de tintes). Mediante una gran cantidad de puntos de medición durante la amplificación, todo el procedimiento puede seguirse y puede realizarse una determinación cuantitativa de la concentración de ácido nucleico del gen diana. La normalización de la mezcla de PCR se efectúa midiendo un gen "housekeeping" (de trabajo doméstico) (por ejemplo ARN 18S, β-actina). Estrategias alternativas mediante muestras de ADN etiquetadas por fluorescencia permiten igualmente la determinación cuantitativa del gen diana de una muestra de tejido específico (véanse las aplicaciones TaqMan de la compañía Applied Biosystems).

2. Clonación

La clonación de todo el gen diana que se requiere para caracterización adicional del antígeno tumoral se clona de acuerdo con procedimientos corrientes de biología molecular (por ejemplo en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience). Con el fin de clonar el gen diana o analizar su secuencia, dicho gen se amplifica primero por una polimerasa de ADN que tiene una función de lectura de prueba (por ejemplo, pfu, Roche Diagnostics). El amplicon es ligado luego mediante métodos estándar a un vector de clonación. Se identifican clones positivos mediante análisis de secuencia y se caracterizan a continuación con la ayuda de programas de predicción y algoritmos conocidos.

3. Predicción de la proteína

Muchos de los genes encontrados de acuerdo con la invención (principalmente del dominio de XM de la RefSeq) son genes recién descubiertos para los cuales tiene que clonarse el gen en toda su longitud, determinarse el marco de lectura abierta y derivarse y analizarse la secuencia de proteína.

Para la clonación en toda la longitud de la secuencia han sido usados los protocolos corrientes para "Rapid amplification of cADN ends" [amplificación rápida de extremos de ADNc], así como el cribado de las bibliotecas de expresión de ADNc con muestras específicas al gen (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Después de componer los fragmentos encontrados de esta manera, se predijeron los marcos de lectura abierta (ORF) potenciales. Puesto que la posición de la cola de PolyA y de los motivos de poliadenilación predetermina la orientación del producto génico potencial, solamente permanecen los 3 marcos de lectura de la orientación respectiva de 6 marcos de lectura posibles. Con frecuencia de estos se obtiene solamente un marco de lectura suficientemente grande que puede codifica una proteína, mientras que los otros marcos de lectura presentan demasiados codones de parada y no codificarían proteínas reales. En el caso de marcos de lectura abierta alternativos, la identificación del ORF auténtico es apoyada tomando en cuenta los criterios de Kozak para iniciación de transcripción óptima analizando las secuencias de proteína derivadas que resulten potencialmente. Esto se verifica adicionalmente generando inmunosueros contra proteínas derivadas de los ORFs potenciales y analizando para reconocimiento de una proteína real en tejidos y líneas celulares.

4. Obtención de anticuerpos

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

Los antisueros que contienen anticuerpos específicos que se enlazan a la proteína diana pueden prepararse mediante diferentes procedimientos estándar; cf. Por ejemplo "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" de Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9, "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow, David

Lane ISBN: 0879693142 y "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447. En este caso también es posible generar anticuerpos afines y específicos que reconocen proteínas complejas de membrana en su forma nativa (Azorsa et al., J. Immunol. Methods 229: 35-48, 1999; Anderson et al., J. Immunol. 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, J. Immunol. Methods. 234: 107-116, 2000).

5 Esto es de importancia ante todo para la preparación de anticuerpos que deben emplearse de modo terapéutico, pero también para muchas aplicaciones diagnósticas. Para este propósito, es posible inmunizarse tanto con toda la proteína, como también con secuencias parciales extracelulares.

Inmunización de obtención de anticuerpos policlonales

10 Una especie (por ejemplo conejos, ratones) es inmunizada mediante una primera inyección de la proteína diana deseada. Mediante una segunda o una tercera inmunización dentro de un tiempo definido (cerca de 2-4 semanas después de la última inmunización) puede intensificarse la respuesta inmune del animal contra el inmunogen. A su vez, después de diferentes lapsos definidos (primer sangrado después de 4 semanas, luego cada 2-3 semanas hasta 5 tomas) se toma sangre de los animales y se obtiene inmunosuero. Los inmunosueos tomados de esta manera contienen anticuerpos policlonales con los cuales puede detectarse y caracterizarse la proteína diana en el Western blot, mediante la citometría de flujo, la inmunofluorescencia o la inmunohistoquímica.

15 La inmunización de los animales se efectúa por lo regular mediante cualquiera de los cuatro procedimientos bien establecidos, aunque también existen otros procedimientos. En este caso pueden inmunizarse con péptidos específicos para la proteína diana, la proteína completa, con secuencias parciales extracelulares de una proteína que puede identificarse experimentalmente o mediante programas de predicción. Puesto que los programas de predicción no funcionan siempre sin errores, en ciertas circunstancias también se opera con dos dominios que están separados uno del otro mediante un dominio de transmembrana. Uno de los dos dominios tiene que ser entonces extracelular, lo cual puede ser probado luego experimentalmente (véase más adelante).

20 (1) En el primer caso, se sintetizan péptidos (longitud: 8-12 aminoácidos) mediante un procedimiento in vitro (posible por medio de un servicio comercial) y estos péptidos se usan para inmunización. Por lo regular se efectúan 3 inmunizaciones (por ejemplo con una concentración de 5-100 µg/inmunización). La realización de la inmunización también puede efectuarse como un servicio por parte de proveedores de servicios.

25 (2) Como una alternativa, la inmunización puede realizarse usando proteínas recombinantes. Para este propósito el ADN clonado del gen diana es clonado a un vector de expresión y se sintetiza la proteína diana de manera análoga a las condiciones del fabricante respectivo (por ejemplo Roche Diagnostics, Invitrogen, Clontech, Qiagen) por ejemplo, sin células in vitro, en bacterias (por ejemplo E. coli), en levaduras (por ejemplo S. pombe), en células de insectos o en células de mamíferos. En este caso, la síntesis de la proteína diana también es posible con ayuda de sistemas de expresión virales (por ejemplo baculovirus, virus de vacuna, adenovirus). Después de la síntesis en uno de los sistemas se purifica la proteína diana. La purificación se efectúa en este caso por lo regular mediante procedimientos cromatográficos. En tal caso, también pueden usarse proteínas para la inmunización las cuales disponen de un ancla molecular como producto auxiliar para la purificación (por ejemplo etiqueta His-Tag, Qiagen; etiqueta FLAG-Tag, Roche Diagnostics; proteínas de fusión GST). Una gran cantidad de protocolos se encuentran, por ejemplo, en los "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience. Después de purificar la proteína diana se efectúa una inmunización tal como se ha descrito antes.

30 (3) si se encuentra disponible una línea celular que sintetiza la proteína deseada de modo endógeno, también es posible usar esta línea celular directamente para preparar el antisuero específico. En este caso se realiza la inmunización por medio de 1-3 inyecciones respectivamente con aproximadamente 1-5 x 10⁷ células.

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

Obtención de anticuerpos monoclonales

40 Los anticuerpos monoclonales se preparan tradicionalmente con la ayuda de la tecnología hibridoma (véanse detalles técnicos: 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). Como un nuevo procedimiento también se emplea la tecnología llamada "SLAM". En este caso se aíslan células B de la sangre entera y se monoclonan las células. A continuación, el sobrenadante de las células B aisladas es analizado para su especificidad de anticuerpo. En contraste a la tecnología de hibridoma, la región variable del gen del

anticuerpo se amplifica luego mediante PCR de célula individual y se clona a un vector adecuado. De esta manera se acelera la obtención de anticuerpos monoclonales (de Wildt et al. J. Immunol. Methods 207:61-67,1997).

5. Validación de la diana con procedimiento químico de proteína usando anticuerpos

5 Los anticuerpos, que pueden prepararse tal como se han descrito antes, pueden usarse para hacer un número de declaraciones importantes acerca de la proteína diana. De manera específica son útiles los siguientes análisis de validación de la proteína diana:

Especificidad del anticuerpo

10 Con el fin de mostrar que un anticuerpo se enlaza específicamente sólo a la proteína diana deseada, los ensayos a base de cultivos celulares con Western blot subsiguiente son los más adecuados (diferentes variaciones se describen, por ejemplo, en "Current Protocols in Proteinchemistry", John Wiley & Sons Ltd., Wiley InterScience). Para la detección, son transfectadas las células con un ADNc para la proteína diana, la cual se encuentra bajo control de un promotor fuerte eucariota (por ejemplo, un promotor de citomegalovirus; CMV). Para la transfección de líneas celulares con ADN se encuentran bien establecidos los más diversos procedimientos (por ejemplo electroporación, transfección a base de liposomas, precipitación de fosfato de calcio) (por ejemplo Lemoine et al., 15 Methods Mol. Biol. 75: 441-7, 1997). Como una alternativa también es posible usar líneas celulares que expresan el gen diana de modo endógeno (detección por medio de RT-PCR específica para el gen diana). Como un control, en el caso ideal, son cotransfectados genes homólogos en el experimento a fin de poder demostrar la especificidad del anticuerpo analizado en el siguiente Western blot.

20 En el subsiguiente Western blot, se lisan las células del cultivo celular o de las muestras tisulares que pueden contener la proteína diana en una solución al 1% de SDS y en tal caso las proteínas son desnaturalizadas. Los lisados son fraccionados de acuerdo con el tamaño mediante electroforesis sobre geles de poli(acrilamida desnaturalizantes al 8-15% (contienen 1% de SDS) (electroforesis en gel de poli(acrilamida SDS, SDS-PAGE). A continuación, las proteínas se transfieren mediante uno de varios procedimientos de Blotting (por ejemplo electroblot semiseco; Biorad) sobre una membrana específica (por ejemplo nitrocelulosa, Schleicher & Schüll). La proteína deseada puede visualizarse sobre esta membrana. Para este propósito, la membrana se incubaba primero con el anticuerpo que reconoce la proteína diana (dilución aproximada de 1:20-1:200, según la especificidad del anticuerpo), durante 60 minutos. Después de un paso de lavado, la membrana es incubada con un segundo anticuerpo que se acopla a un marcador (por ejemplo enzimas tales como peroxidasa o fosfatasa alcalina) el cual reconoce el primer anticuerpo. Luego es posible hacer visible la proteína diana sobre la membrana en una reacción de color o quimioluminiscente (por ejemplo ECL, Amersham Bioscience). Un anticuerpo con una alta especificidad para la proteína diana en caso ideal debe reconocer sólo la proteína deseada misma.

Localización de la proteína diana

35 Se usan diversos métodos para confirmar la localización de membrana, identificada en la estrategia in silico, de la proteína diana. Un método importante y bien establecido que usa los anticuerpos descritos antes es la inmunofluorescencia (IF). Para este propósito se utilizan células de líneas celulares establecidas las cuales sintetizan la proteína diana (detección del ARN en la RT-PCR o de la proteína en Western blot) o sino han sido transfectadas con ADN de plásmido. Los más diversos procedimientos (por ejemplo electroporación, transfección a base de liposoma, precipitación de fosfato de calcio) están bien establecidos para transfección de líneas celulares con ADN (por ejemplo Lemoine et al., Methods Mol. Biol. 75: 441-7, 1997). El plásmido transfectadas las células, en la inmunofluorescencia, puede codificar la proteína no modificada o sino acoplar diferentes marcadores de aminoácidos a la proteína diana. Los marcadores más importantes son, por ejemplo, la proteína fluorescente verde ("green fluorescent protein" (GFP)) en sus diferentes formas fluorescentes de manera diferencial, secuencias de péptido cortas de 6-12 aminoácidos, para los cuales se encuentran disponibles anticuerpos de alta afinidad y especificidad, o la secuencia corta de aminoácidos Cys-Cys-X-X-Cys-Cys, que pueden enlazar sustancias fluorescentes específicas por medio de su cisteína (Invitrogen). Las células que sintetizan la proteína diana se fijan, por ejemplo, con paraformaldehído o metanol. Si se requiere, las células pueden permeabilizarse luego mediante incubación con detergentes (por ejemplo 0,2% de Triton X-100). A continuación se incuban las células con un anticuerpo primario el cual está dirigido contra uno de los marcadores acoplados. Después de un paso de lavado, la mezcla es incubada con un segundo anticuerpo acoplado a un marcador fluorescente (por ejemplo fluorescina, Texas Red, Dako) que se enlaza al primer anticuerpo. A continuación, las células marcadas de esta manera se recubren con glicerina y se analizan con la ayuda de un microscopio de fluorescencia de acuerdo con los datos del fabricante. En este caso se logran emisiones de fluorescencia que son específicos mediante excitación específica dependiendo de las sustancias empleadas. El análisis usualmente permite localización confiable de la proteína diana, y para confirmar la calidad del anticuerpo y de la proteína diana en tinturado doble, adicionalmente a la proteína diana, también se trituran los marcadores de aminoácido acoplados u otras proteínas marcadoras cuya localización ya ha sido descrita en la bibliografía. Un caso especial representa GFP y sus derivados que pueden excitarse directamente y fluorescen ellos mismos. La permeabilidad de la membrana que puede controlarse empleando detergentes permite en la inmunofluorescencia la demostración de si un epítipo inmunogénico se localiza dentro o fuera de la célula. Por lo tanto, la predicción de las proteínas seleccionadas puede soportarse

experimentalmente., La detección de dominios extracelulares puede efectuarse por medio de citometría de flujo. Para este propósito se fijan las células en condiciones no permeabilizantes (por ejemplo con PBS/azida de Na/2% de FCS/ 5 mM de EDTA) y se analizan en un citómetro de flujo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Solamente pueden reconocerse epítomos extracelulares por el anticuerpo que va analizarse en este procedimiento.

5 A diferencia de la inmunofluorescencia, usando yoduro de propidio o azul de Trypan, por ejemplo, es posible distinguir entre células muertas y vivas y, por lo tanto, pueden impedirse resultados falsos positivos.

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

20 Por lo regular, tejidos tumorales definidos histológicamente y, como referencia, tejidos comparablemente sanos se emplean en la IHC. También es posible usar como controles positivos y negativos las líneas celulares en las cuales la presencia del gen diana se conoce por medio de análisis de RT-PCR. Siempre tiene que incluirse un control de fondo.

25 Las piezas de tejido fijadas en formalina (otro procedimiento de fijación, por ejemplo con metanol, también es posible) e incrustadas con parafina, que tienen un grosor de 4 µm, se aplican sobre un soporte de vidrio y se desparafinan con xileno, por ejemplo. Las muestras se lavan con TBS-T y se bloquean en suero. A continuación se efectúa la incubación con el primer anticuerpo (dilución: 1:2 a 1:2000) durante 1-18 horas, y por lo regular se usan anticuerpos purificados por afinidad. Después de un paso de lavado se efectúa una incubación de aproximadamente 30-60 minutos con un segundo anticuerpo el cual está acoplado con una fosfatasa alcalina (como alternativa, por ejemplo, peroxidasa) y está dirigido contra el primer anticuerpo. A continuación se efectúa una reacción de color usando la fosfatasa alcalina (cf. por ejemplo Shi et al., J. Histochem. Cytochem. 39: 741-748, 1991; Shin et al., Lab. Invest. 64: 693-702, 1991). Para detectar la especificidad del anticuerpo puede bloquearse la reacción mediante adición previa del inmunogen.

Análisis de modificaciones de proteína

35 Modificaciones secundarias de proteína tales como, por ejemplo, N- y O-glicosilaciones o miristilaciones pueden obstaculizar o incluso impedir completamente la accesibilidad de epítomos inmuno génicos y por lo tanto poner en duda la efectividad de las terapias de anticuerpo. Además, se ha demostrado frecuentemente que el tipo y la cantidad de modificaciones secundarias difieren en tejidos normales y tumorales (por ejemplo Durand & Seta, 2000; Clin. Chem. 46: 795-805; Hakomori, 1996; Cancer Res. 56: 5309-18). Por lo tanto, el análisis de estas modificaciones es esencial para el éxito terapéutico de un anticuerpo. Los sitios de enlazamiento potenciales pueden predecirse mediante algoritmos específicos.

45 El análisis de modificaciones de proteína por lo regular tiene lugar mediante Western blot (véase antes). Ante todo las glicosilaciones que por lo regular tienen un tamaño de varios kDa, conducen a una masa total más grande de la proteína diana que puede fraccionarse en SDS-PAGE. Para detectar enlaces O- y N-glicosídicos específicos, los liofilizados de proteína se incuban antes de la desnaturalización por SDS con O- o N-glicosilasas (de acuerdo con la información del fabricante respectivo, por ejemplo PNGasa, endoglicosidasa F, endoglicosidasa H, Roche Diagnostics). A continuación se efectúa un Western blot tal como se ha descrito antes. Al reducir el tamaño de una proteína diana puede detectarse una glicosilación específica después de incubación con una glicosidasa y de esta manera también se analiza la especificidad del tumor de una modificación.

Análisis de función del gen diana

50 La función de la molécula diana puede ser crucial para su utilidad terapéutica de modo que los análisis funcionales son un componente importante en la caracterización de moléculas terapéuticamente utilizables. Los análisis funcionales pueden tener lugar ya sea en células en experimentos de cultivo celular o sino in vivo con la ayuda de modelos animales. Esto incluye apagar el gen de la molécula diana mediante mutación ("knockout") o insertando la secuencia diana en la célula o el organismo ("knockin"). Por lo tanto es posible analizar modificaciones funcionales en un contexto celular primero por medio de la pérdida de función del gen que va analizarse ("loss of function"). En el segundo caso pueden analizarse modificaciones causadas completando el gen analizado ("gain of function").

a. Análisis de función en las células

Transfección. Para analizar la "gain of function", el gen de la molécula diana tienen que transferirse a la célula. Para este propósito se transfectan células que permiten síntesis de la molécula diana con un ADN. Por lo regular, el gen de la molécula diana aquí se encuentra bajo el control de un promotor eucariota fuerte (por ejemplo promotor de citomegalovirus; CMV). Para la transfección de líneas celulares con ADN se encuentran bien establecidos los más diversos procedimientos (por ejemplo electroporación, transfección a base de liposomas, precipitación de fosfato de calcio) (por ejemplo Lemoine et al., *Methods Mol. Biol.* 75: 441-7, 1997). El gen puede sintetizarse ya sea de manera transitoria, sin integración genómica, cocinó establemente, con integración genómica después de la selección con neomicina, por ejemplo.

Interferencia de ARN (ARNsi). Una inhibición de expresión del gen diana que puede inducir una pérdida completa de función de la molécula diana en las células pueden generarse por la tecnología de interferencia de ARN (ARNsi) en células (Hannon, G.J. 2002. *RNA interference. Nature* 418: 244-51; Czauderna et al. 2003. *Nucl. Acid Res.* 31: 670-82). Para este propósito son transfectadas células con moléculas cortas de ARN bicatenario de aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud que son específicas para la molécula diana. Un procedimiento enzimático da lugar luego a la degradación del ARN específico del gen diana y, por lo tanto, a una inhibición de la función de la proteína diana y, por lo tanto, permite el análisis del gen diana.

Líneas celulares que han sido modificadas por medio de transfección o de ARNsi pueden analizarse a continuación de diferentes maneras. Los ejemplos más comunes se listan más adelante.

1. Proliferación y conducta del ciclo celular

Una gran cantidad de métodos para analizar proliferación celular se encuentran establecidos y se suministran comercialmente por diversas compañías (por ejemplo Roche Diagnostics, Invitrogen, los detalles sobre el procedimiento de prueba se describen en los numerosos protocolos de aplicación). El número de células en los experimentos de cultivo celular puede determinarse mediante un conteo simple o mediante ensayos colorimétricos que miden la actividad metabólica de las células (por ejemplo wst-1, Roche Diagnostics). Los procedimientos de ensayo metabólicos miden la cantidad de células en un experimento de manera indirecta por medio de marcadores enzimáticos. La proliferación celular puede medirse directamente analizando la velocidad de síntesis de ADN, adicionando por ejemplo bromodesoxiuridina (BrdU), en cuyo caso la detección de la BrdU integradas se efectúa de modo colorimétrico mediante anticuerpos específicos.

2. Apoptosis y citotoxicidad

Una gran cantidad de sistemas de ensayo para detectar apoptosis celular y citotoxicidad se encuentran disponibles. Una característica decisiva es la fragmentación específica, dependiente de enzima, del ADN genómico que es irreversible y conduce seguramente a la muerte de la célula. Los procedimientos para detectar estos fragmentos específicos de ADN se encuentran comercialmente disponibles. Un procedimiento adicional disponible es el ensayo TUNEL que puede detectar rupturas de una hebra de ADN incluso en secciones tisulares. La citotoxicidad se detecta principalmente por medio de una permeabilidad modificada de la célula que sirve como marcador del estado de vitalidad de las células. Para este propósito en el sobrenadante de cultivo celular se analizan los marcadores que normalmente pueden encontrarse a nivel intracelular. Como alternativa, también es posible analizar la capacidad de absorción de marcadores de tinte que no están absorbidos por las células intactas. Los ejemplos mejores conocidos de marcadores de tinte son Trypan azul y yoduro de propidio, un marcador intracelular común es deshidrogenasa de lactato que puede detectarse enzimáticamente en el sobrenadante. Se encuentran disponibles diferentes sistemas de ensayo de diversos proveedores comerciales (por ejemplo Roche Diagnostics, Invitrogene).

3. Ensayo de migración

La capacidad de las células para migrar se analiza en un ensayo específico de vibración, preferiblemente con la ayuda de una cámara Boyden (Corning Costar) (Cinamon G., Alon R. J. *Immunol. Methods.* 2003 Feb; 273(1-2):53-62; Stockton et al. 2001. *Mol. Biol. Cell.* 12: 1937-56). Para este propósito se cultivan células en un filtro con un tamaño de poro específico. Las células que pueden migrar son capaces de migrar a través de este filtro a otro recipiente de cultivo abajo. Los análisis microscópicos subsiguientes permiten luego la determinación de una conducta de migración posiblemente modificada, inducida por la ganancia de función o la pérdida de función de la molécula diana.

b. Análisis de función en modelos animales

Como alternativa de los experimentos en cultivos celulares para el análisis de la función del gen diana se ofrecen experimentos complejos in vivo en modelos animales. En comparación con los procedimientos a base de células, estos modelos tienen la ventaja de poder detectar desarrollos erróneos o enfermedades que son detectables solamente el contexto del organismo entero. Entretanto se encuentra disponible una gran cantidad de modelos para trastornos humanos en la actualidad (Abate-Shen & Shen. 2002. *Trends in Genetics* pp. 1-5; Matsusue et. al. 2003. *J. Clin. Invest.* 111:737-47). Diversos modelos animales tales como, por ejemplo, levadura, nemátodos o pez cebra entretanto han sido caracterizados intensamente. Sin embargo, los modelos que se prefieren sobre otras especies

son modelos de animales mamíferos tales como, por ejemplo, el ratón (*Mus musculus*), porque ofrecen la mejor posibilidad de reproducir procesos biológicos en un contexto humano. Para los ratones por una parte los métodos transgénicos que integran nuevos genes al genoma del ratón han sido establecidos en años recientes ("gain of function" [adquisición de función]; Jegstrup I. et al. 2003. *Lab Anim.* 2003 enero;37(1):1-9). Como alternativa, otras estrategias metodológicas apagan genes en el genoma del ratón y por lo tanto inducen una pérdida de función de un gen deseado (modelos knockout, "loss of function" [pérdida de función]; Zambrowicz BP & Sands AT. 2003. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003 enero; 2(1):38-51; Niwa H. 2001. *Cell Struct. Funct.* 2001 Jun;26(3):137-48.); Los detalles técnicos han sido publicados de manera variada.

Después de la generación de modelos de ratón, las modificaciones que han sido inducidas por el transgén o por la pérdida de función de un gen pueden analizarse en el contexto del organismo entero (Balling R, 2001. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:463-92). De esta manera son posibles, por ejemplo, los ensayos de comportamiento así como también los estudios bioquímicos de parámetros de sangre establecidos. Análisis histológicos, inmunohistoquímica o la microscopía electrónica hacen posible la caracterización de las modificaciones a nivel celular. El patrón específico de expresión de un gen puede detectarse mediante una hibridación *in situ* (Peters T. et al. 2003. *Hum. Mol. Genet* 12: 2109-20).

Ejemplo 3: Identificación de LOC203413 como diana diagnóstica y terapéutica de cáncer

El gen y, respectivamente, la proteína del locus génico LOC203413 (secuencia de ácido nucleico: SEQ ID NO: 9; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 10) es un gen hasta ahora no caracterizado sobre el cromosoma X (Xq24). Aparte de un dominio de transmembrana, no tiene otros motivos funcionales ni homologías con las proteínas ya conocidas.

Las publicaciones WO01/00806 y WO98/55508 describen respectivamente una gran cantidad de ácidos nucleicos diferentes que codifican potencialmente proteínas secretadas o proteínas de transmembrana o partes de tales proteínas. De las publicaciones WO01/00806 y WO98/55508 también resulta respectivamente una secuencia de aminoácidos que es idéntica con la secuencia de SEQ ID NO: 10. Sin embargo, las publicaciones WO01/00806 y WO98/55508 no muestran una expresión específica de tumor de los antígenos de acuerdo con la invención.

Después del establecimiento de una RT-PCR cuantitativa, específica de LOC203413 (par de cebadores SEQ ID NO: 11 y 12), se ha investigado la cantidad de la transcripción en tejido sano y en muestras de carcinoma (combinación de muestras, la cantidad se indica en la figura) (Fig. 1; A: evaluación cuantitativa, B: imagen después de fraccionamiento por electroforesis en gel). El ARN específico de LOC203413 no puede detectarse en ninguno de los tejidos sanos estudiados por los inventores, con excepción de los testículos. Por consiguiente, es altamente probable que LOC203413 sea un producto génico específico de la célula de germen. Tal como muestra la figura 1, las transcripciones específicas de LOC203413 en carcinomas de estómago, de páncreas, de esófago, de mama, de ovarios y de próstata fueron detectables; principalmente en carcinomas de estómago y de mama pudo observarse una alta expresión. Con el fin de profundizar el análisis se caracterizaron adicionalmente muestras de estómago sano así como muestras de carcinoma de estómago en una RT-PCR cuantitativa (Fig. 2A). En el 70% de los carcinomas LOC203413 estaba expresado, mientras que en ninguna de las muestras sanas de estómago fue detectable una expresión significativa. La línea celular MKN45, cuyo origen es un carcinoma de estómago, también expresa LOC203413. Adicionalmente, fue detectada una expresión específica en 2/3 de los tumores de páncreas estudiados y en 40% de los carcinomas de hígado (Fig. 2B). Por lo tanto, LOC203413 es un representante típico de la clase de los llamados antígenos de cáncer/testículos que, en tejidos normales, se expresan exclusivamente en las células de germen de los testículos. Sin embargo, en tumores, los antígenos de cáncer/testículos con frecuencia se encienden aunque no se expresen en las células tisulares normales somáticas subyacentes. Varios miembros de esta clase funcionalmente y estructuralmente heterogéneo ya se han ensayado para estrategias inmuno terapéuticas específicas con cánceres en estudios de fase I/II, debido a su distribución tisular selectiva atractiva (por ejemplo Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. 2002. *Immunol Rev.* 2002 Oct; 188: 22-32).

Principalmente el dominio extracelular de LOC203413 puede utilizarse de acuerdo con la invención como estructura diana de anticuerpos monoclonales. Por lo tanto, los aminoácidos 22-113 (SEQ ID NO: 284) son interesantes como epítomos. Los motivos de N-glicosilación conservados se localizan en la secuencia en las posiciones de aminoácidos 34 y 83 respecto de la SEQ ID NO: 10, y tales motivos pueden ser adecuados particularmente para producir anticuerpos específicos para un tumor. Para la preparación de anticuerpos específicos de LOC203413 han sido usados los péptidos listados en SEQ ID NO: 285 y 286.

De acuerdo con la invención, otras estrategias orientadas a las dianas tales como vacunas y terapias con pequeños compuestos que tienen solamente este gen como estructura diana y, por lo tanto, no afectan células sanas, también son terapéuticamente concebibles. Dicho gen también puede utilizarse como diagnóstico debido a su selectividad para las células tumorales.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

ES 2 634 705 T3

<120> Identificación de antígenos-superficies celulares asociados a tumor para el diagnóstico y la terapia

<130> 342-10 EPT3

<150> DE 103 44 799.7

<151> 2003-09-26

5 <160> 7

<170> PatentIn Version 3.1

<210> 9

<211> 543

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 9

```
ataaagcggg acaacacaga acttcccagt tacaccaggc atcctggccc aaagtttccc 60
aatccaggc ggctagaggc ccaactgctc ccaactacca gctgaggggg tccgtcccga 120
gaagggagaa gaggccgaag aggaaacatg aacttctatt tactcctagc gagcagcatt 180
ctgtgtgcct tgattgtctt ctggaaatat cgcgcctttc agagaaacac tggcgaaatg 240
tcatcaaatt caactgctct tgcaactagtg agaccctctt cttctgggtt aattaacagc 300
aatacagaca acaatcttgc agtctacgac ctctctcggg atattttaaa taatttccca 360
cactcaatag ccaggcagaa gcgaatattg gtaaacctca gtatggtgga aaacaagctg 420
gttgaactgg aacatactct acttagcaag ggtttcagag gtgcatcacc tcaccggaaa 480
tccacctaaa agcgtacagg atgtaatgcc agtgggtgga atcattaaag acactttgag 540
tag 543
```

<210> 10

<211> 113

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 634 705 T3

Met Asn Phe Tyr Leu Leu Leu Ala Ser Ser Ile Leu Cys Ala Leu Ile
1 5 10 15

Val Phe Trp Lys Tyr Arg Arg Phe Gln Arg Asn Thr Gly Glu Met Ser
20 25 30

Ser Asn Ser Thr Ala Leu Ala Leu Val Arg Pro Ser Ser Ser Gly Leu
35 40 45

Ile Asn Ser Asn Thr Asp Asn Asn Leu Ala Val Tyr Asp Leu Ser Arg
50 55 60

Asp Ile Leu Asn Asn Phe Pro His Ser Ile Ala Arg Gln Lys Arg Ile
65 70 75 80

Leu Val Asn Leu Ser Met Val Glu Asn Lys Leu Val Glu Leu Glu His
85 90 95

Thr Leu Leu Ser Lys Gly Phe Arg Gly Ala Ser Pro His Arg Lys Ser
100 105 110

Thr

<210> 11

<211> 22

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 11

gtgtgccttg attgtcttct gg 22

10 <210> 12

<211> 19

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido

<400> 12

cctggctatt gagtggtgg 19

<210> 284

<211> 91

ES 2 634 705 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 284

```

Arg Phe Gln Arg Asn Thr Gly Glu Met Ser Ser Asn Ser Thr Ala Leu
1           5           10           15

Ala Leu Val Arg Pro Ser Ser Ser Gly Leu Ile Asn Ser Asn Thr Asp
           20           25           30

Asn Asn Leu Ala Val Tyr Asp Leu Ser Arg Asp Ile Leu Asn Asn Phe
           35           40           45

Pro His Ser Ile Ala Arg Gln Lys Arg Ile Leu Val Asn Leu Ser Met
           50           55           60

Val Glu Asn Lys Leu Val Glu Leu Glu His Thr Leu Leu Ser Lys Gly
65           70           75           80

Phe Arg Gly Ala Ser Pro His Arg Lys Ser Thr
           85           90
    
```

5 <210> 285

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 285

```

Cys Lys Tyr Arg Arg Phe Gln Arg Asn Thr Gly Glu Met Ser Ser
10           1           5           10           15
    
```

<210> 286

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 286

```

Cys Lys Gly Phe Arg Gly Ala Ser Pro His Arg Lys Ser Thr
1           5           10
    
```

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende uno o varios componentes que se seleccionan del grupo compuesto por:
- 5 (i) un antígeno asociado a tumor o una parte del mismo que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor tal como se define en (a),
- (ii) un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor o una parte del mismo, que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a un tumor tal como se define en (a),
- (iii) un ácido nucleico antisentido que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor,
- 10 (iv) una célula hospedera que expresa un antígeno asociado a un tumor, o una parte del mismo, que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a un tumor tal como se define en (a), y
- (v) complejos aislados entre un antígeno asociado a un tumor o una parte del mismo que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a un tumor tal como se define en (a), y una molécula de HLA,
- 15 en la cual el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por:
- (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y
- (b) un ácido nucleico que presenta al menos 80% de identidad de los nucleótidos con el ácido nucleico de (a).
- 20 2. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se enlaza a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 10 del listado de secuencias.
3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual la célula hospedera secreta el antígeno asociado a tumor o la parte del mismo, expresa sobre la superficie o expresa una molécula de HLA que se enlaza al antígeno asociado a tumor o a la parte del mismo.
- 25 4. Composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3 para el tratamiento de una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor.
5. Procedimiento para diagnosticar una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, el cual comprende
- (i) la detección de un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor, y/o
- (ii) la detección del antígeno asociado a un tumor y/o
- 30 (iii) la detección de un anticuerpo que se enlaza a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 10 del listado de secuencias, y/o
- (iv) la detección de linfocitos T citotóxicos o auxiliares que son específicos para el antígeno asociado a tumor o a una parte del mismo, que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor tal como se define en (a),
- 35 en una muestra biológica aislada de un paciente,
- en cuyo caso el antígeno asociado a tumor representa una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por:
- (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y
- 40 (b) un ácido nucleico que presenta al menos 80% de identidad al ácido nucleico de (a).
6. Procedimiento para determinar la regresión, el curso o el inicio de una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, el cual comprende el monitoreo de una muestra de un paciente que presenta la enfermedad o del cual se sospecha que contrajo la enfermedad, con respecto a uno o varios parámetros seleccionados del grupo compuesto por:

- (i) la cantidad del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor,
 - (ii) la cantidad del antígeno asociado a tumor,
 - (iii) la cantidad de anticuerpos que se enlazan a la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 10 del listado de secuencias, y
- 5 (iv) la cantidad de células T citolíticas o que liberaron citocina que son específicas para un complejo entre el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo el cual comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor tal como se define en (a), y una molécula de MHC,
- en cuyo caso el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por:
- 10 (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y
 - (b) un ácido nucleico que presenta al menos 80% de identidad de los nucleótidos al ácido nucleico de (a).
7. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la cual el anticuerpo se encuentra acoplado con un producto terapéutico o diagnóstico.
- 15 8. Anticuerpo que está acoplado con un producto terapéutico o diagnóstico y se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 10 del listado de secuencias.
9. Anticuerpo para el uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor,
- 20 y el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácido de acuerdo con SEQ ID NO: 10, el antígeno asociado a tumor es codificado por un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por:
- (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y
 - (b) un ácido nucleico que presenta al menos 80% de identidad de los nucleótidos al ácido nucleico de (a).
- 25 10. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8 para el uso en un procedimiento para el tratamiento, diagnóstico o monitoreo de una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, en cuyo caso el procedimiento comprende la administración del anticuerpo y el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por:
- (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y
 - 30 (b) un ácido nucleico que presenta al menos 80%, de identidad de los nucleótidos al ácido nucleico de (a).
11. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8 para el uso en un procedimiento para el tratamiento, diagnóstico o monitoreo de un tumor que hace metástasis, el cual se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno de tumor, y el procedimiento comprende la administración del anticuerpo y el antígeno de tumor presenta una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por:
- 35 (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y
 - (b) un ácido nucleico que presenta al menos 80% de identidad de los nucleótidos al ácido nucleico de (a).
- 40 12. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 o 7, composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8 o anticuerpo para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11, en cuyo caso el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo.
13. Células T citolíticas o que liberan citocina para el uso en un procedimiento para el tratamiento de un paciente con una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, el cual comprende:
- 45 (i) la remoción de una muestra con células inmuno reactivas del paciente,

(ii) la puesta en contacto de la muestra con una célula hospedera que expresa el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo el cual comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor, definido tal como en (a), en condiciones que favorecen una producción de células T citolíticas o que liberan citocina contra el antígeno asociado a tumor, y

- 5 (iii) la introducción de las células T citolíticas o que liberan citocina a los pacientes en una cantidad que es adecuada para lisar células que expresan el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo, el cual comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor, tal como se define en (a),

en cuyo caso el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por:

- 10 (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y

(b) un ácido nucleico que presenta al menos 80% de identidad de los nucleótidos al ácido nucleico de (a).

- 15 14. Células T citolíticas o que liberan citocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en las cuales la célula hospedera expresa de modo recombinante o endógeno una molécula de HLA que se enlaza al antígeno asociado a tumor o a la parte del mismo.

15 15. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 12, procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, anticuerpo para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 12, o células T citolíticas o que liberan citocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en la cual la enfermedad es cáncer.

- 20 16. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, 12 o 15, procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, anticuerpo para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 12, o células T citolíticas o que liberan citocina para el uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en la cual la enfermedad es cáncer de colon, rectal, de riñones, de mama, de próstata, de útero, de ovarios, endometrial, de esófago, de sangre, de hígado, de páncreas, de piel, del cerebro o de los pulmones, un linfoma o neuroblastoma, un tumor en pulmón, mama, próstata, carcinoma de células renales, de cervix, de colon, de estómago o de mama o metástasis de los tipos anteriores de cáncer o de tumores.

- 30 17. Composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, 7 y 12, composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 4, 12, 15 y 16, procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 5, 6, 15 y 16, anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, anticuerpo para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 12, 15 y 16, o células T citolíticas o que liberan citocina para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 a 16, en cuyo caso el antígeno de tumor o el antígeno asociado a tumor comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por SEQ ID NOS: 10, 284, 285 y 286 del listado de secuencias.

18. Kit para detección de la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, el cual comprende productos para detectar

- 35 (i) el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor,

(ii) el antígeno asociado a tumor,

(iii) anticuerpos que se enlazan a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 10 del listado de secuencias, y/o

- 40 (iv) células T que son específicas para un complejo entre el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo, que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor, tal como se define en (a), y una molécula de MHC, y el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo compuesto por:

(a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y

- 45 (b) un ácido nucleico que presenta al menos 80% de identidad de los nucleótidos al ácido nucleico de (a).

19. Composición farmacéutica que comprende la interferencia de ARN (iARN) que inhibe la expresión o la actividad de los antígenos de tumor de acuerdo con SEQ ID NOS: 10, 284, 285, 286, del listado de secuencias.

20. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19, en la cual la iARN contiene una estructura de short hairpin (de horquilla corta) (ARNsh).

21. Uso de un kit para el diagnóstico de una enfermedad que se caracteriza por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, que comprende productos para la detección de

(i) el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor, o una parte del mismo,

(ii) el antígeno asociado a tumor o de una parte del mismo,

5 (iii) anticuerpos que se enlazan a la secuencia de aminoácido de acuerdo con SEQ ID NO: 10 del listado de secuencias, y/o

(iv) células T que son específicas para un complejo entre el antígeno asociado a tumor o una parte del mismo y una molécula de MHC,

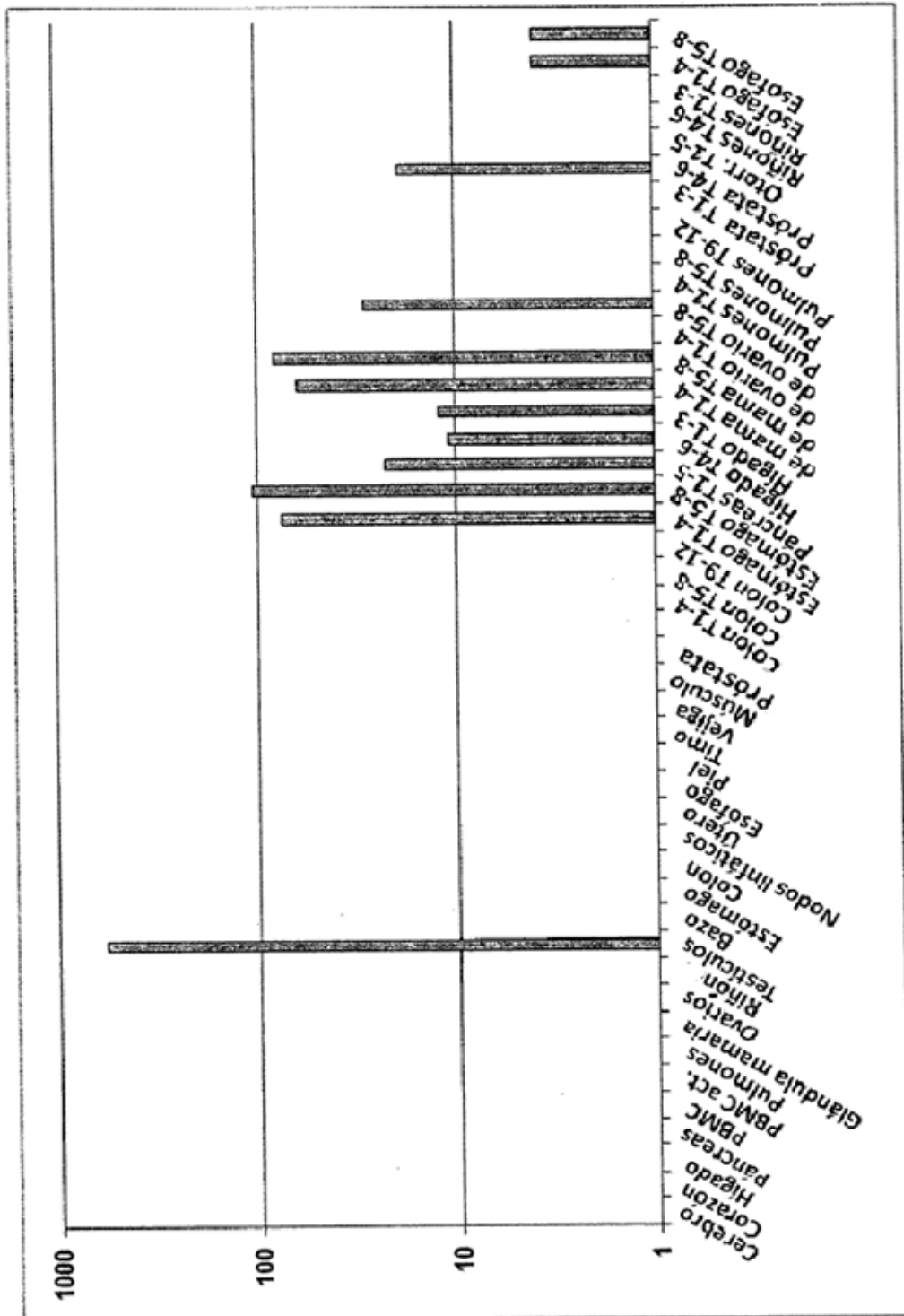
10 y la parte de acuerdo con (i), (ii) y (iv) comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor, tal como se define en (a),

el antígeno asociado a tumor presenta una secuencia que es codificada por un ácido nucleico seleccionado del grupo compuesto por:

(a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 del listado de secuencias, y

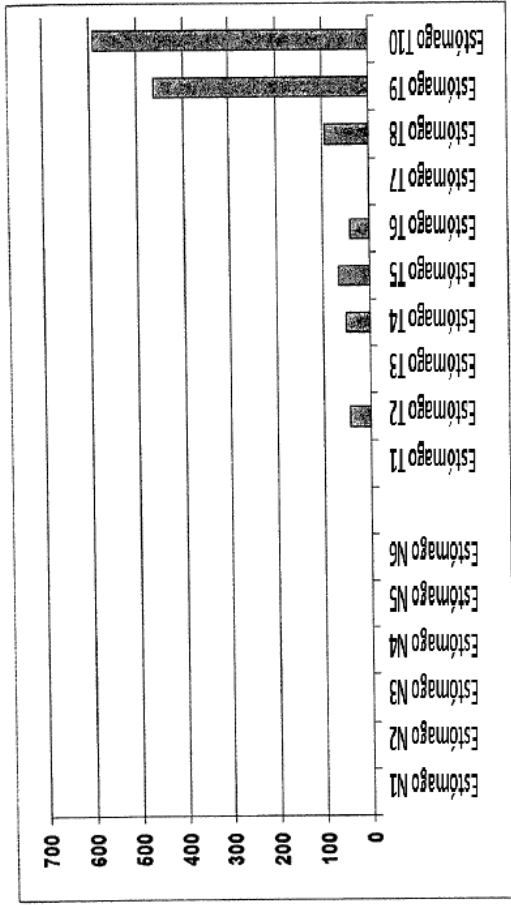
15 (b) un ácido nucleico que presenta al menos 80% de identidad de los nucleótidos al ácido nucleico de (a).

Fig. 1



A

Fig. 2



Estomago T1
Estomago T2
Estomago T3
Estomago T4
Estomago T5
Estomago T6
Estomago T7
Estomago T8
Estomago T9
Estomago T1
Pancreas T1
Pancreas T11
Pancreas T12
Pancreas T13
Pancreas T14
Pancreas T15
Pancreas T16

Higado T1
Higado T2
Higado T3
Higado T4
Higado T5
Higado T6
Higado T7
Higado T8
Higado T9
Higado T10

A

B