

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 386**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2006 E 15153951 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2894162**

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

30 Prioridad:

12.09.2005 EP 05019786

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

19.04.2018

73 Titular/es:

**GANYMED PHARMACEUTICALS AG (50.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE y
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ,
VERTRETEN DURCH DEN PRÄSIDENTEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 664 386 T3

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

DESCRIPCIÓN

Identificación de antígenos asociados a tumor para el diagnóstico y la terapia

5 A pesar de los enfoques interdisciplinarios y el uso exhaustivo de procedimientos terapéuticos clásicos, los cánceres todavía se encuentran entre las principales causas de muerte. Los conceptos terapéuticos más recientes se dirigen a incorporar el sistema inmunitario del paciente en el concepto terapéutico global mediante el uso de vacunas tumorales recombinantes y otras medidas específicas tales como la terapia con anticuerpo. Un requisito previo para el éxito de este tipo de estrategias es el reconocimiento de antígenos o epítomos específicos de tumores o antígenos asociados a tumor por parte del sistema inmunitario del paciente cuyas funciones efectoras se mejoran mediante una intervención. Las células tumorales se diferencian biológicamente sustancialmente de sus células de origen no malignas. Estas diferencias se deben a alteraciones genéticas adquiridas durante el desarrollo del tumor y resultan, entre otras, además, en la formación de estructuras moleculares cualitativa o cuantitativamente alteradas en las células cancerosas. Las estructuras asociadas a tumores de este tipo que son reconocidas por el sistema inmunitario específico del huésped que aloja el tumor se denominan antígenos asociados a tumor. El reconocimiento específico de antígenos asociados a tumor involucra mecanismos celulares y humorales que son dos unidades interconectadas funcionalmente: los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ reconocen los antígenos procesados presentados en las moléculas del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) de las clases II y I, respectivamente, mientras que los linfocitos B producen moléculas de anticuerpos circulantes que se unen directamente a los antígenos no procesados. La importancia clínico terapéutica potencial de los antígenos asociados a tumor resulta del hecho de que el reconocimiento de antígenos en células neoplásicas por parte del sistema inmunitario conduce al inicio de los mecanismos efectores citotóxicos y, en la presencia de células T cooperadoras, puede producir la eliminación de las células cancerosas (Pardoll, Nat. Med. 4:525-31, 1998). En consecuencia, un objetivo principal de la inmunología del tumor es definir molecularmente estas estructuras. La naturaleza molecular de estos antígenos ha sido un enigma durante mucho tiempo. Sólo tras el desarrollo de técnicas de clonación adecuadas ha sido posible tamizar las librerías de expresión del ADNc de tumores de forma sistemática para encontrar antígenos asociados a tumor mediante el análisis de las estructuras objetivo de los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) (van der Bruggen y otros, Science 254:1643-7, 1991) o mediante el uso de autoanticuerpos circulantes (Sahin y otros, Curr. Opin. Immunol. 9:709-16, 1997) como sondas. Con este propósito, se prepararon librerías de expresión de ADNc a partir de tejido tumoral fresco y se expresaron recombinantemente como proteínas en sistemas adecuados. Se usaron inmunofectores aislados de pacientes, específicamente, clones de CTL con patrones de lisis específicos de tumor, o autoanticuerpos circulantes para clonar los antígenos respectivos.

En años recientes se ha definido una multiplicidad de antígenos en diversas neoplasias mediante estos enfoques.

35 Sin embargo, las sondas usadas para la identificación de antígenos en los métodos clásicos son inmunofectores (autoanticuerpos circulantes o clones de CTL) a partir de pacientes que usualmente ya presentan un cáncer avanzado. Algunos datos indican que los tumores pueden conducir a, por ejemplo, la tolerancia y la anergia de las células T y que, durante el curso de la enfermedad, especialmente aquellas especificidades que podrían provocar un reconocimiento inmunitario eficaz se pierden del repertorio inmunofector. Los estudios con pacientes actuales todavía no han proporcionado cualquier evidencia sólida de una acción real de los antígenos asociados a tumor encontrados y usados previamente. En consecuencia, no puede descartarse que las proteínas que provocan respuestas inmunitarias espontáneas sean las estructuras objetivo incorrectas.

45 El objeto de la presente invención fue proporcionar estructuras objetivo para el diagnóstico y terapia de los cánceres.

Este objeto se alcanza mediante el contenido que se proporciona en las reivindicaciones.

50 De acuerdo con la presente descripción, se identifican genes que se expresan de forma selectiva o aberrante en las células tumorales y, por lo tanto, proporcionan antígenos asociados a tumor. Estos genes y/o sus productos genéticos y/o los derivados y/o fragmentos de estos resultan útiles como estructuras objetivo para los enfoques terapéuticos y de diagnóstico.

Los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción tienen una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que se selecciona del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 28, 30, 35, 39, 41, 45, 49, 61, 62, y 64-67 del listado de secuencias, una parte o un derivado de esta, (b) un ácido nucleico que se hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones rigurosas, (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 modalidad preferida, un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 28, 30, 35, 39, 41, 45, 49, 61, 62, y 64-67 del listado de secuencias. En una modalidad preferida adicional, un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 29, 31, 36, 40, 42, 46, 50-60, 63, 68, y 69 del listado de secuencias, una parte o un derivado de esta.

65

La presente descripción se refiere generalmente al uso de antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción o de partes o derivados de estos, de ácidos nucleicos que codifican antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción o de partes o derivados de estos o de ácidos nucleicos dirigidos contra dichos ácidos nucleicos codificantes, de anticuerpos o células T dirigidos contra los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción o partes o derivados de estos y/o de células huésped que expresan los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción o partes o derivados de estos para terapia, profilaxis, diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades neoplásicas. Además, esto puede involucrar el uso de una combinación de dos o más de estos antígenos, ácidos nucleicos, anticuerpos, células T y/o células huésped, en una modalidad también en combinación con antígenos asociados a tumor distintos de los identificados de acuerdo con la descripción, ácidos nucleicos que los codifican o ácidos nucleicos dirigidos contra dichos ácidos nucleicos que codifican, anticuerpos o células T dirigidos contra dichos antígenos asociados a tumor y/o células huésped que expresan dichos antígenos asociados a tumor.

En aquellas modalidades de la descripción con relación al uso de anticuerpos dirigidos contra los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción o partes o derivados de esta, pueden usarse, además, receptores de células T dirigidos contra los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción o partes o derivados de esta, opcionalmente en un complejo con moléculas de CMH.

Especialmente adecuados para la terapia, profilaxis, diagnóstico y/o seguimiento es una parte de los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción que corresponde a la porción no transmembrana, en particular la porción extracelular de los antígenos asociados a tumor, o que se comprende de estos. Por lo tanto, de acuerdo con la descripción, una parte de los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción que corresponde a la porción no transmembrana, en particular la porción extracelular de los antígenos asociados a tumor, o que se comprende de estos, o una parte correspondiente de los ácidos nucleicos que codifican para los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción, se prefiere para la terapia, profilaxis, diagnóstico y/o seguimiento. De manera similar se prefiere el uso de anticuerpos que se dirigen contra una parte de los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción que corresponde a la porción no transmembrana, en particular la porción extracelular de los antígenos asociados a tumor o que se comprende de esta.

Las enfermedades preferidas para una terapia, profilaxis y/o diagnóstico son aquellas en las que uno o más de los antígenos asociados a tumor identificados de acuerdo con la descripción se expresan selectivamente o se expresan anormalmente.

Además, la presente descripción se relaciona con ácidos nucleicos y proteínas o péptidos, que resultan de un empalme alterado (variantes de empalme) de genes conocidos o una traducción alterada mediante el uso de marcos de lectura abiertos alternativos.

El empalme alterado de un gen resulta en una secuencia de transcripto alterada (variante de empalme). La traducción de una variante de empalme en la región de su secuencia alterada resulta en una proteína alterada que puede ser claramente diferente en la estructura y función de la proteína original. Las variantes de empalme asociadas a tumores pueden producir transcritos asociados a tumores y proteínas/antígenos asociados a tumor. Estos pueden usarse como marcadores moleculares tanto para detectar células tumorales como para la terapéutica dirigida a tumores. La detección de células tumorales en una muestra de un paciente puede llevarse a cabo de acuerdo con la descripción, por ejemplo, después de la extracción de ácidos nucleicos mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de la variante de empalme.

De acuerdo con la presente descripción, todos los sistemas de detección dependientes de secuencia son adecuados para la detección. Estos son, además de la PCR, por ejemplo, sistemas de chip de genes/micromatrices, Northern blot, ensayos de protección de ARNs (RDA, por sus siglas en inglés) 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 ácidos nucleicos específica de la variante de empalme. Sin embargo, las células tumorales, además, pueden detectarse de acuerdo con la descripción mediante anticuerpos que reconocen un epítipo específico codificado por la variante de empalme. Dichos anticuerpos pueden prepararse mediante el uso de péptidos de inmunización que son específicos para dicha variante de empalme. Adecuadas para la inmunización son particularmente las secuencias de aminoácidos que son claramente diferentes de la(s) variante(s) del producto genético, que es(son) producido(s), preferentemente, en las células sanas. La detección de las células tumorales con anticuerpos puede llevarse a cabo aquí en una muestra aislada del paciente o por imagenología con anticuerpos administrados por vía intravenosa.

Además de la utilidad diagnóstica, las variantes de empalme que tienen epítipos nuevos o alterados son objetivos atractivos para inmunoterapia ya que estos epítipos pueden usarse para dirigir los anticuerpos o linfocitos T, como se describe en la presente. En inmunoterapia pasiva, se transfieren adoptivamente aquí anticuerpos o linfocitos T que reconocen epítipos específicos de la variante de empalme. Como en el caso de otros antígenos, los anticuerpos pueden generarse, además, mediante el uso de tecnologías estándar con la utilización de polipéptidos que incluyen estos epítipos. Alternativamente, es posible usar para la inmunización ácidos nucleicos que codifican para los péptidos que contienen dichos epítipos. Se conocen y han sido descritas en detalle diversas técnicas para la generación in vitro o in vivo de linfocitos T específicos del epítipo (por ejemplo, Kessler JH, y otros, 2001, Sahin y otros, 1997) y se basan igualmente en el uso de péptidos que contienen los epítipos específicos de la variante de empalme o ácidos nucleicos

que codifican para dichos péptidos. Los péptidos que contienen los epítomos específicos de la variante de empalme o ácidos nucleicos que codifican para dichos péptidos pueden usarse, además, como sustancias activas farmacéuticamente en inmunoterapia activa (por ejemplo, vacunación, terapia de vacunas).

5 En un aspecto, la descripción se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un agente que reconoce un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o un ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor y que es selectivo, preferentemente, para células que tienen expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción. En un aspecto adicional, la descripción se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un agente que (I) inhibe la expresión o actividad de un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción, y/o (II) tiene actividad inhibitoria de tumor o de enseñanza de tumor y es selectivo para células que expresan o expresan anormalmente un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción, y/o (III) cuando se administra, aumenta selectivamente la cantidad de complejos entre una molécula de CMH y un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o una parte de este, tal como un epítomo peptídico. En modalidades particulares, dicho agente puede causar inducción de muerte celular, reducción del crecimiento celular, daño en la membrana celular o secreción de citocinas y, preferentemente, tiene una actividad inhibitoria de tumores. En una modalidad, el agente es un ácido nucleico antisentido que se hibrida selectivamente con el ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor. En una modalidad adicional, el agente es un ARNip que comprende, preferentemente, una hebra de ARN sentido y una hebra de ARN antisentido, en donde las hebras de ARN sentido y antisentido forman un dúplex de ARN, y en donde la hebra de ARN sentido comprende una secuencia de nucleótidos idéntica sustancialmente a una secuencia objetivo de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos contiguos en un ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor, preferentemente, ARNm que codifica para el antígeno asociado a tumor. En una modalidad adicional, el agente es un anticuerpo que se enlaza selectivamente a un antígeno asociado a tumor, en particular un anticuerpo activado con complemento o conjugado con toxina que se enlaza selectivamente al antígeno asociado a tumor. En una modalidad preferida, el anticuerpo que se enlaza selectivamente al antígeno asociado a tumor se acopla a una sustancia útil terapéuticamente y/o recluta mecanismos efectores naturales o artificiales para dicha célula que expresa o que expresa anormalmente dicho antígeno asociado a tumor. En una modalidad adicional, el agente es un linfocito T citotóxico que reconoce el antígeno asociado a tumor o una parte de este unida por una molécula del CMH en una célula y lisa las células marcadas de esta forma. En una modalidad adicional, el agente es un linfocito T cooperador que aumenta las funciones efectoras de otras células que reconocen específicamente dicho antígeno asociado a tumor o una parte de este.

En una modalidad adicional, el agente comprende dos o más agentes en el que cada uno reconoce diferentes antígenos asociados a tumor y/o inhibe la expresión o actividad de diferentes antígenos asociados a tumor, y/o tienen una actividad inhibitoria de tumores o destructora de tumores y son selectivos para las células que expresan o que expresan anormalmente diferentes antígenos asociados a tumor, y/o cuando se administran, aumentan selectivamente la cantidad de complejos entre las moléculas de CMH y diferentes antígenos asociados a tumor o partes de estos, en donde al menos uno de dichos antígenos asociados a tumor diferentes es un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la presente descripción. Preferentemente, un antígeno asociado a tumor limitado selectivamente a tumores sirve como un marcador para reclutar mecanismos efectores a esta ubicación específica. La descripción incluye modalidades en donde el agente en sí no tiene una habilidad para inhibir la actividad de un antígeno asociado a tumor o actividad inhibitoria de tumores o destructora de tumores, pero es mediador de tal efecto, en particular, mediante el reclutamiento de mecanismos efectores, en particular aquellos que tienen potencial de daño celular, para una localización específica, en particular un tumor o células tumorales.

45 La actividad de un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción puede ser cualquier actividad de una proteína o un péptido. En una modalidad, esta actividad es una actividad enzimática.

De acuerdo con la descripción descrita en la presente, la frase "inhibe la expresión o actividad" incluye una inhibición completa o esencialmente completa de la expresión o actividad y una reducción de la expresión o actividad.

50 El agente que, cuando se administra, incrementa selectivamente la cantidad de complejos entre una molécula del CMH y un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la presente descripción o una parte de este, comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en (i) el antígeno asociado a tumor o una parte de este, (ii) un ácido nucleico que codifica para dicho antígeno asociado a tumor o una parte de este, (iii) una célula huésped que expresa dicho antígeno asociado a tumor o una parte de este, y (iv) complejos aislados entre los epítomos peptídicos de dicho antígeno asociado a tumor y una molécula del CMH.

60 La descripción se relaciona, además, a una composición farmacéutica que comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en (i) un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o una parte de este, (ii) un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o una parte de este, (iii) un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o a una parte de este, (iv) un ácido nucleico antisentido que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción, (v) un ARNip dirigido contra un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción, (vi) una célula huésped que expresa un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o una parte de esta,

y (vii) complejos aislados entre un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o una parte de este y una molécula de CMH.

5 En una modalidad, un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor o una parte de este se presenta en la composición farmacéutica en un vector de expresión y se une funcionalmente a un promotor. En una modalidad adicional, un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor o una parte de este se presenta en una composición farmacéutica en un virus, como se describe más abajo.

10 En una modalidad adicional, una célula huésped presente en una composición farmacéutica de la descripción secreta el antígeno asociado a tumor o una parte de este, lo expresa en la superficie y, preferentemente, expresa adicionalmente una molécula del CMH que se enlaza a dicho antígeno asociado a tumor o a dicha parte de este. En una modalidad, la célula huésped expresa endógenamente la molécula del CMH. En una modalidad adicional, la célula huésped expresa de forma recombinante una molécula del CMH y/o el antígeno asociado a tumor o la parte de este. Preferentemente, la célula huésped es no proliferativa. En una modalidad preferida, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

15 En una modalidad adicional, un anticuerpo presente en una composición farmacéutica descrita en la presente es un anticuerpo monoclonal. En otras modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, un fragmento de un anticuerpo natural o un anticuerpo sintético. El anticuerpo puede acoplarse a un agente útil terapéutica o diagnósticamente, también denominado en la presente descripción agente terapéutico o de diagnóstico.

20 Un ácido nucleico antisentido presente en una composición farmacéutica puede comprender una secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 y 20-30, nucleótidos contiguos del ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción.

25 En modalidades adicionales, un antígeno asociado a tumor o una parte de este, proporcionado por una composición farmacéutica de la descripción tanto directamente o a través de la expresión de un ácido nucleico, se enlaza a moléculas del CMH en la superficie de las células, dicho enlace causa, preferentemente, una respuesta citolítica y/o la inducción de la liberación de citocinas.

30 En modalidades particulares del ARNip dirigidas al ácido nucleico de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1 la cadena de ARN sentido tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 70 y la cadena de ARN antisentido tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 71, o la cadena de ARN sentido tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 72 y la cadena de ARN antisentido tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 73.

35 Una composición farmacéutica puede comprender un portador compatible farmacéuticamente y/o un adyuvante.

40 Una composición farmacéutica se usa, preferentemente, para el tratamiento o prevención de una enfermedad caracterizada por la expresión selectiva o la expresión anormal de un antígeno asociado a tumor. En una modalidad preferida, la enfermedad es una enfermedad neoplásica, preferentemente, cáncer.

45 En una modalidad preferida, la composición farmacéutica está en forma de una vacuna que puede usarse terapéuticamente o profilácticamente. Dicha vacuna comprende, preferentemente, un antígeno asociado a tumor o una parte de este, y/o un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor, identificado de acuerdo con la invención o una parte de este. En modalidades particulares, el ácido nucleico se presenta en un virus o célula huésped.

50 La presente descripción se relaciona, además, con métodos de tratamiento, prevención, diagnóstico o seguimiento, es decir para la determinación de la regresión, el progreso, el curso y/o la aparición de una enfermedad caracterizada por la expresión o la expresión anormal de uno a más antígenos asociados a tumor, preferentemente, una enfermedad neoplásica, en particular cáncer. En una modalidad, el tratamiento o la prevención comprende la administración de una composición farmacéutica de la descripción.

55 Dichos métodos de diagnóstico y/o métodos de seguimiento se refieren en general a la detección y/o determinación de la cantidad de uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en (i) un ácido nucleico, que codifica para un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la descripción, o una parte de este, (ii) un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la descripción, o una parte de este, (iii) un anticuerpo contra un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la descripción o una parte de este, y (iv) linfocitos T, preferentemente, linfocitos T cooperadores o citotóxicos, que son específicos para un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la descripción, o una parte de este y/o un complejo entre el antígeno asociado a tumor o una parte de este y una molécula del CMH, en una muestra biológica aislada de un paciente, preferentemente, de un paciente que tiene dicha enfermedad, que se sospecha que tiene o que padece dicha enfermedad o que tiene un potencial para dicha enfermedad. Los medios para llevar a cabo dicha detección y/o determinación de la cantidad se describen en la presente y serán evidentes para la persona experta.

65 Preferentemente, la presencia de dicho ácido nucleico, dicho antígeno asociado a tumor o dicha parte de este, dicho anticuerpo y/o dichos linfocitos T y/o una cantidad de dicho ácido nucleico, dicho antígeno asociado a tumor o dicha parte

de este, dicho anticuerpo y/o dichos linfocitos T, que está aumentada en comparación con un paciente sin dicha enfermedad, es indicativo de la presencia de dicha enfermedad o del potencial para el desarrollo de dicha enfermedad.

5 Los métodos de diagnóstico y/o de seguimiento descritos en la presente invención incluyen, además, modalidades en donde mediante la detección o la determinación de la cantidad de dicho ácido nucleico, dicho antígeno asociado a tumor o dicha parte de este, dicho anticuerpo y/o dichos linfocitos T, es posible evaluar y/o pronosticar el comportamiento metastásico de dicha enfermedad, en donde, preferentemente, la presencia de dicho ácido nucleico, dicho antígeno asociado a tumor o dicha parte de este, dicho anticuerpo y/o dichos linfocitos T y/o una cantidad de dicho ácido nucleico, dicho antígeno asociado a tumor o dicha parte de este, dicho anticuerpo y dichos linfocitos T, que está aumentada en comparación con un paciente sin dicha enfermedad o sin una metástasis de dicha enfermedad, es indicativo de un comportamiento metastásico de dicha enfermedad o de un potencial para un comportamiento metastásico de dicha enfermedad.

15 En modalidades particulares, dicha detección o determinación de la cantidad comprende (i) poner en contacto una muestra biológica con un agente que se une específicamente a dicho ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumor o dicha parte de este, a dicho antígeno asociado a tumor o dicha parte de este, a dicho anticuerpo o a dicha parte de este o a dichos linfocitos T, y (ii) detectar la formación o determinación de la cantidad de un complejo entre el agente y el ácido nucleico o la parte de este, el antígeno asociado a tumor o la parte de este, el anticuerpo o la parte de este, o los linfocitos T. En una modalidad, la enfermedad se caracteriza por la expresión o expresión anormal de dos o más antígenos asociados a tumor diferentes y una detección o determinación de la cantidad comprende una detección o determinación de la cantidad de dos o más ácidos nucleicos que codifican dichos dos o más diferentes antígenos asociados a tumor o partes de estos, de dos o más antígenos asociados a tumor diferentes o partes de estos, de dos o más anticuerpos que se unen a dichos dos o más antígenos asociados a tumor diferentes o a partes de estos y/o de dos o más linfocitos T específicos para dichos dos o más antígenos asociados a tumor diferentes o partes de estos, o complejos de estos con moléculas de CMH. En una modalidad adicional, la muestra biológica aislada del paciente se compara con una muestra biológica normal comparable.

25 Los métodos de seguimiento de acuerdo con la presente enseñanza comprenden, preferentemente, una detección y/o determinación de la cantidad de uno o más de los parámetros mencionados anteriormente en una primera muestra en un primer instante en el tiempo y en una muestra adicional en un segundo instante en el tiempo, en donde el curso de la enfermedad se determina mediante la comparación de las dos muestras.

30 De acuerdo con en la presente descripción], la detección de un ácido nucleico o de una parte de este, o la determinación de la cantidad de un ácido nucleico o de una parte de este puede llevarse a cabo mediante el uso de una sonda de oligo o polinucleótido que se hibrida específicamente con dicho ácido nucleico o dicha parte de este, o puede llevarse a cabo mediante la amplificación selectiva de dicho ácido nucleico o dicha parte de este, por ejemplo, por medio de amplificación por PCR. En una modalidad, la sonda de oligo o polinucleótido comprende una secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 y 20-30, nucleótidos contiguos de dicho ácido nucleico.

35 En modalidades particulares, el antígeno asociado a tumor o la parte de este que ha de detectarse o la cantidad que va a determinarse en los métodos descritos en la presente descripción se presenta intracelularmente, en la superficie celular o en un complejo con una molécula del CMH. De acuerdo con la presente descripción, la detección de un antígeno asociado a tumor o de una parte de este, o la determinación de la cantidad de un antígeno asociado a tumor o de una parte de este puede llevarse a cabo mediante el uso de un anticuerpo que se enlaza específicamente a dicho antígeno asociado a tumor o dicha parte de este.

40 De acuerdo con la presente descripción, la detección de un anticuerpo o la determinación de la cantidad de un anticuerpo puede llevarse a cabo mediante el uso de una proteína o péptido que se enlaza específicamente a dicho anticuerpo.

45 De acuerdo con la presente descripción, la detección de o la determinación de la cantidad de linfocitos T que son específicos para un antígeno asociado a tumor o una parte de este y/o un complejo del mismo con una molécula del CMH puede llevarse a cabo mediante el uso de una célula que presenta el complejo entre dicho antígeno asociado a tumor o dicha parte de este y una molécula del CMH. Los linfocitos T pueden detectarse adicionalmente mediante la detección de su proliferación, su producción de citocinas, y su actividad citotóxica desencadenada mediante la estimulación específica con un complejo de una molécula del CMH y un antígeno asociado a tumor o una parte de este. Los linfocitos T pueden detectarse, además, con la ayuda de una molécula del CMH recombinante o un complejo de dos o más moléculas del CMH cargadas con fragmentos inmunogénicos de uno o más antígenos asociados a tumor.

50 Un agente que se usa para la detección o la determinación de la cantidad en los métodos descritos en la presente, tal como una sonda de oligo o polinucleótido, un anticuerpo, una proteína o un péptido o una célula, se marca, preferentemente, de manera detectable, en particular, por un marcador detectable tal como un marcador radiactivo o un marcador enzimático.

55 En un aspecto particular, la descripción se relaciona con un método para tratar, prevenir, diagnosticar o dar seguimiento a una enfermedad caracterizada por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la descripción, método que comprende la administración de un anticuerpo que se enlaza a dicho antígeno asociado a

tumor o una parte de este y que se acopla a un agente terapéutico o de diagnóstico. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En modalidades adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado o un fragmento de un anticuerpo natural.

5 En determinadas modalidades, los métodos para diagnosticar o dar seguimiento a una enfermedad caracterizada por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la invención, pueden llevarse a cabo con una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene células tumorales diseminadas o células tumorales metastásicas. Dichas muestras biológicas incluyen, por ejemplo, sangre, suero, médula ósea, esputo, aspirado bronquial, y/o lavado bronquial.

10 En un aspecto particular, la presente descripción se relaciona con un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad caracterizada por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la presente descripción, método que comprende (i) proporcionar una muestra que contenga células inmunorreactivas, obtenida de dicho paciente o de otro individuo de la misma especie, en particular un individuo sano, o un individuo de una especie diferente, (ii) poner en contacto dicha muestra con una célula huésped que expresa dicho antígeno asociado a tumor o una parte de este, en condiciones que favorezcan la producción de células T citolíticas contra dicho antígeno asociado a tumor o una parte de este, e (iii) introducir las células T citolíticas en el paciente en una cantidad adecuada para lisar las células que expresan el antígeno asociado a tumor o una parte de este. En una modalidad, el método incluye clonar el receptor de células T o las células T citolíticas obtenidas y transferir el ácido nucleico que codifica para el receptor de células T a células T, obtenida de dicho paciente o de otro individuo de la misma especie, en particular un individuo sano, o un individuo de especie diferente, cuyas células T reciben de esta forma la especificidad deseada y, como en (iii), pueden introducirse en el paciente.

25 En una modalidad, la célula huésped expresa endógenamente una molécula del CMH. En una modalidad adicional, la célula huésped expresa recombinantemente una molécula del CMH y/o el antígeno asociado a tumor o la parte de este. Preferentemente, la célula huésped presenta el antígeno asociado a tumor o la parte de este mediante moléculas de CMH en su superficie. Preferentemente, la célula huésped es no proliferativa. En una modalidad preferida, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

30 La presente enseñanza se relaciona, además, con un método para tratar una enfermedad caracterizada por la expresión o expresión anormal de un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la descripción, método que comprende (i) identificar las células del paciente que expresan cantidades anormales del antígeno asociado a tumor, (ii) aislar una muestra de dichas células, (iii) cultivar dichas células, e (iv) introducir dichas células en el paciente en una cantidad adecuada para desencadenar una respuesta inmunitaria a las células.

35 La presente descripción se relaciona, además, con un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 28, 30, 35, 39, 41, 45, 49, 61, 62, y 64-67, una parte o derivado de esta, (b) un ácido nucleico que se hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones rigurosas, (c) un ácido nucleico que es 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). La descripción se relaciona, además, con un ácido nucleico, que codifica para una proteína o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 29, 31, 36, 40, 42, 46, 50-60, 63, 68, y 69, una parte o un derivado de estas.

45 En un aspecto adicional, la presente descripción se relaciona con una molécula de ácido nucleico recombinante, en particular una molécula de ADN o ARN, que comprende un ácido nucleico de la enseñanza.

La enseñanza se relaciona, además, con células huésped que contienen una molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico recombinante de la descripción.

50 La célula huésped puede comprender, además, un ácido nucleico que codifica para una molécula de CMH. En una modalidad, la célula huésped expresa endógenamente la molécula de CMH. En una modalidad adicional, la célula huésped expresa recombinantemente la molécula de CMH y/o la molécula de ácido nucleico o de ácido nucleico recombinante o una parte de esta. Preferentemente, la célula huésped es no proliferativa. En una modalidad preferida, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

55 En una modalidad adicional, la presente enseñanza se relaciona con oligonucleótidos que se hibridan con un ácido nucleico identificado de acuerdo con la descripción, y que pueden usarse como sondas genéticas o como moléculas "antisentido".

60 Las moléculas de ácido nucleico en forma de cebadores oligonucleotídicos o sondas competentes, que se hibridan con un ácido nucleico identificado de acuerdo con la presente descripción o partes de este, pueden usarse para encontrar ácidos nucleicos que son homólogos a dicho ácido nucleico identificado de acuerdo con la descripción, por ejemplo, por amplificación por PCR, hibridación Southern y Northern. La hibridación puede llevarse a cabo en baja astringencia, con mayor preferencia, en condiciones de rigurosidad media, y con la máxima preferencia, en condiciones de alta rigurosidad.

65

- 5 En un aspecto adicional, lo enseñado se relaciona con una proteína o péptido que se codifica por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 28, 30, 35, 39, 41, 45, 49, 61, 62, y 64-67, una parte o derivado de esta, (b) un ácido nucleico que se hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones rigurosas, (c) un ácido nucleico que es degenerado con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c). En una modalidad preferida, la descripción se relaciona con una proteína o péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 29, 31, 36, 40, 42, 46, 50-60, 63, 68, y 69, una parte o un derivado de estas.
- 10 En un aspecto adicional, lo enseñado se relaciona con un fragmento inmunogénico de un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción. Dicho fragmento se enlaza preferentemente a una molécula de CMH o un anticuerpo, preferentemente a un receptor HLA humano o un anticuerpo humano. De acuerdo con la presente descripción, un fragmento comprende, preferentemente, una secuencia de al menos 6, en particular al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50, aminoácidos.
- 15 En este aspecto la descripción se relaciona, en particular, con un péptido que tiene o comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 51-60, 68 y 69 del listado de secuencias, una parte o derivado de estas.
- 20 En un aspecto adicional, la presente enseñanza se relaciona con un agente que se enlaza a un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o a una parte de este. En una modalidad preferida, el agente es una proteína o péptido, en particular un anticuerpo, un receptor de células T o una molécula de CMH. En modalidades adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, quimérico, o humanizado, un anticuerpo producido mediante técnicas combinatorias, o un fragmento de un anticuerpo. En una modalidad preferida, la presente descripción se refiere a un anticuerpo que se une selectivamente a un complejo de (i) un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o una parte de este y (ii) una molécula de CMH a la que dicho antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o dicha parte de este se une, con dicho anticuerpo que no se une a (i) o (ii) solo.
- 25 En particular, la presente descripción se refiere a dicho agente, en particular un anticuerpo, que se enlaza específicamente a un péptido que tiene o comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 51-60, 68 y 69 del listado de secuencias, una parte o derivado de estas.
- 30 De acuerdo con la descripción, el término "enlazamiento" se relaciona, preferentemente, con un enlazamiento específico. "Enlazamiento específico" significa que un agente tal como un anticuerpo se enlaza más fuertemente a un objetivo tal como un epítipo para el que es específico en comparación con el enlazamiento con otro objetivo. Un agente se enlaza más fuertemente a un primer objetivo en comparación con un segundo objetivo si se enlaza al primer objetivo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la constante de disociación para el segundo objetivo. Preferentemente, la constante de disociación (K_D) para el objetivo al cual se enlaza específicamente el agente es más de 10 veces, preferentemente, más de 20 veces, con mayor preferencia, más de 50 veces, aún con mayor preferencia, más de 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1.000 veces menor que la constante de disociación (K_D) para el objetivo al cual el agente no se enlaza específicamente.
- 35 Dichos anticuerpos específicos pueden, por ejemplo, obtenerse por inmunización mediante el uso de los péptidos antes mencionados.
- 40 La presente enseñanza se relaciona, además, con un conjugado entre un agente de la descripción que se une a un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción o a una parte de este o un anticuerpo de la descripción y un agente terapéutico o de diagnóstico. En una modalidad, el agente terapéutico o de diagnóstico es una toxina.
- 45 En un aspecto adicional, lo enseñado se refiere a un kit para detectar la expresión o la expresión anormal de un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción, cuyo kit comprende agentes para la detección o la determinación de la cantidad (i) del ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor o de una parte de este, (ii) del antígeno asociado a tumor o de una parte de este, (iii) de anticuerpos que se enlazan al antígeno asociado a tumor o a una parte de este, y/o (iv) de células T que son específicas para el antígeno asociado a tumor o una parte de este o un complejo de este con una molécula de CMH. En una modalidad, los agentes para la detección del ácido nucleico o la parte de este son moléculas de ácido nucleico para la amplificación selectiva de dicho ácido nucleico, que comprenden, en particular, una secuencia de 6-50, en particular, 10-30, 15-30 y 20-30, nucleótidos contiguos de dicho ácido nucleico.
- 50 Descripción detallada de la invención
- 55 Como se usa en la presente, puede usarse una "referencia", tal como una muestra de referencia o un organismo de referencia, para correlacionar y comparar los resultados obtenidos en los métodos de la descripción a partir de una muestra de prueba u organismo de prueba, es decir, un paciente. Normalmente, el organismo de referencia es un organismo sano, en particular un organismo que no padece cáncer.
- 60
- 65

Un "valor de referencia" puede determinarse empíricamente a partir de una referencia mediante la medición de una cantidad suficientemente grande de referencias. Preferentemente, el valor de referencia se determina mediante la medición de al menos 2, preferentemente, al menos 3, preferentemente, al menos 5, preferentemente, al menos 8, preferentemente, al menos 12, preferentemente, al menos 20, preferentemente al menos 30, preferentemente, al menos 50, o preferentemente, al menos 100 referencias.

"Derivado" de un ácido nucleico de acuerdo con lo enseñado significa que una única o múltiples sustituciones, deleciones y/o adiciones tales como al menos 2, al menos 4, o al menos 6 y, preferentemente, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 10, hasta 15, o hasta 20 nucleótidos se presentan en dicho ácido nucleico. Además, el término "derivado" comprende, además, la formación de un derivado químico de un ácido nucleico o una base nucleotídica, en el azúcar o en el fosfato. El término "derivado" comprende, además, ácidos nucleicos que contienen nucleótidos y análogos de nucleótidos que no ocurren de forma natural.

Como se usa en la presente, un ácido nucleico es, preferentemente, un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos comprenden de acuerdo con la descripción moléculas de ADN genómico, ADNc, ARNm producidas recombinantemente y sintetizadas químicamente. De acuerdo con la descripción, un ácido nucleico puede estar presente como una molécula monocatenaria o bicatenaria y lineal o cerradas covalentemente en forma circular.

Como se usa en la presente descripción, el término "ARN" significa una molécula que comprende al menos un residuo ribonucleotídico. Por "ribonucleotídico" se entiende un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un resto beta-D-ribofuranosa. El término incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tales como ARN parcialmente purificado, ARN sustancialmente puro, ARN sintético o ARN producido recombinantemente, así como también ARN alterado que se diferencia del ARN que ocurre de forma natural por la adición, deleción, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al(los) extremo(s) de un ARN o internamente, por ejemplo, a uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN pueden comprender, además, nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos que no ocurren de forma natural o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse como análogos o análogos de ARN que ocurren de forma natural.

Los ácidos nucleicos descritos de acuerdo con la enseñanza, han sido aislados preferentemente. El término "ácido nucleico aislado" significa de acuerdo con la descripción que el ácido nucleico fue (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) producido recombinantemente mediante clonación, (iii) purificado, por ejemplo, mediante escisión y fraccionamiento electroforético en gel, o (iv) sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que está disponible para su manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

Un ácido nucleico es "complementario" de otro ácido nucleico si las dos secuencias son capaces de hibridar y de formar un dúplex estable entre sí, y en donde la hibridación se realiza, preferentemente, en unas condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones rigurosas). Las condiciones rigurosas 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, New York, 1989 or Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y otros, Editores, John Wiley & Sons, Inc., New York y se refieren, por ejemplo, a una hibridación a 65 °C en un regulador de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina de suero bovino al 0,02%, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7. 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 después en 0,1 - 0,5 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68 °C.

De acuerdo con la descripción, los ácidos nucleicos complementarios tienen al menos un 40 %, en particular al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, preferentemente, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, de nucleótidos idénticos.

Con el término "porcentaje de identidad" se pretende indicar un porcentaje de nucleótidos o de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenido después de la mejor alineación, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen en forma aleatoria y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente mediante la comparación de estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales con similitud de la secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación puede producirse, además de manualmente, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o mediante programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación de la cantidad de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, la división de este número por el número de posiciones comparadas, y la multiplicación por 100 del resultado obtenido de forma que se obtiene el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

5 Los ácidos nucleicos que codifican para los antígenos asociados a tumor pueden, de acuerdo con la descripción, presentarse solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, en particular con ácidos nucleicos heterólogos. En modalidades preferidas, un ácido nucleico se enlaza funcionalmente a secuencias de control de expresión o a secuencias reguladoras que pueden ser homologas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico. Una secuencia de codificación y una secuencia reguladora se unen "funcionalmente" entre sí, si se enlazan covalentemente entre sí de tal forma que la expresión o transcripción de dicha secuencia de codificación está bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia reguladora. Si la secuencia de codificación debe traducirse en una proteína funcional, entonces, con una secuencia reguladora unida funcionalmente a dicha secuencia de codificación, la inducción de dicha secuencia reguladora resulta en la transcripción de dicha secuencia de codificación, sin provocar un cambio de marco en la secuencia de codificación o sin que dicha secuencia de codificación pueda traducirse en la proteína o péptido deseado.

15 El término "secuencia de control de la expresión" o "secuencia reguladora" comprende, de acuerdo con la descripción, promotores, potenciadores y otros elementos de control que regulan la expresión de un gen. En modalidades particulares de la descripción, pueden regularse las secuencias de control de la expresión. La estructura exacta de las secuencias reguladoras puede variar en función de la especie o del tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas que se implican en el inicio de la transcripción y de la traducción, respectivamente, tal como la caja TATA, la secuencia protectora, y la secuencia CAAT. Más específicamente, las secuencias reguladoras 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen unido funcionalmente. Las secuencias reguladoras pueden comprender, además, secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en dirección corriente arriba.

25 De acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico puede, además, estar presente en combinación con otro ácido nucleico que codifica para un péptido que controla la secreción de la proteína o el péptido codificado por dicho ácido nucleico de una célula huésped. De acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico puede estar presente, además, en combinación con otro ácido nucleico que codifica para un péptido que provoca que la proteína o el péptido codificado se ancle a la membrana celular de la célula huésped o compartimentalizada en orgánulos especiales de dicha célula. De forma similar, es posible una combinación con un ácido nucleico que representa un gen reportero o cualquier "etiqueta".

35 En una modalidad preferida, una molécula de ácido nucleico recombinante es de acuerdo con la descripción un vector, cuando sea apropiado un promotor, que controla la expresión de un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor identificado de acuerdo con la descripción. El término "vector" se usa en la presente en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permite que dicho ácido nucleico, por ejemplo, se introduzca en células procariotas y/o eucariotas y, cuando sea apropiado, se integre en un genoma. Preferentemente, los vectores de este tipo se replican y/o se expresan en las células. Puede adaptarse un vehículo intermediario, por ejemplo, para su uso en la electroporación, en el bombardeo con microproyectiles, en la administración liposomal, en la transferencia con la ayuda de agrobacterias o en la inserción a través de virus ADN o ARN. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas víricos.

45 Los ácidos nucleicos que codifican para un antígeno asociado a tumor identificados de acuerdo con la descripción, pueden usarse para la transfección de células huésped. Los ácidos nucleicos en la presente significan tanto ADN como ARN recombinante. El ARN recombinante puede prepararse mediante una transcripción *in vitro* de un patrón de ADN. Además, puede modificarse mediante secuencias de estabilización, encapsulamiento y poliadenilación antes de su aplicación.

50 Como se usa en la presente descripción, el término "célula huésped" se relaciona con cualquier célula que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término "células huésped" comprende de acuerdo con la descripción 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). Se da particular preferencia a células de mamífero tales como las células de humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras, primates. Las células pueden derivarse de una multiplicidad de tipos de tejidos y comprenden células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos comprenden queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de la médula ósea y células madre embrionarias. En modalidades adicionales, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula huésped en la forma de una sola copia o de dos o más copias y, en una modalidad, se expresa en la célula huésped.

60 Como se usa en la presente descripción, el término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína. Comprende, además, la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede llevarse a cabo de forma transitoria o estable. Los sistemas de expresión preferidos en células de mamíferos comprenden pcADN3,1 y pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene un marcador seleccionable, tal como un gen que imparte resistencia a G418 (y, de esta forma, permite que se seleccionen las líneas celulares transfectadas en forma estable) y las secuencias potenciadoras-promotoras de citomegalovirus (CMV).

65

En aquellos casos de la descripción en los que una molécula del CMH presenta un antígeno asociado a tumor o una parte de este, un vector de expresión puede comprender, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha molécula de CMH. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la molécula de CMH pueda estar presente en el mismo vector de expresión que el ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor o parte de este, o ambos ácidos nucleicos pueden estar presentes en vectores de expresión diferentes. En este último caso, los dos vectores de expresión pueden cotransfectarse a una célula. Si una célula huésped no expresa el antígeno asociado a tumor o una parte de este ni la molécula de CMH, ambos ácidos nucleicos que codifican para ello pueden transfectarse en la célula tanto en el mismo vector de expresión como en vectores de expresión diferentes. Si la célula ya expresa la molécula de CMH, sólo puede transfectarse en la célula la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para el antígeno asociado a tumor o la parte de este.

La presente descripción abarca, además, kits para la amplificación de un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor. Tales kits comprenden, por ejemplo, un par de cebadores de amplificación que se hibridan con el ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor. Los cebadores comprenden, preferentemente, una secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 y 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico y no solapantes, para evitar la formación de dímeros de cebador. Uno de los cebadores hibridará con una hebra del ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor, y el otro cebador hibridará con la hebra complementaria en una disposición que permite la amplificación del ácido nucleico que codifica para el antígeno asociado a tumor.

Las "moléculas antisentido" o los "ácidos nucleicos antisentido" pueden usarse para regular, en particular reducir, la expresión de un ácido nucleico. El término "molécula antisentido" o "ácido nucleico antisentido" se refiere, de acuerdo con la descripción, a un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, un oligodesoxirribonucleótido, un oligorribonucleótido modificado o un oligodesoxirribonucleótido modificado y que se hibrida en condiciones fisiológicas al ADN que comprende un gen en especial o al ARNm de dicho gen, lo que inhibe de esta manera la transcripción de dicho gen y/o la traducción de dicho ARNm. De acuerdo con la descripción, una "molécula antisentido" comprende, además, un constructo que contiene un ácido nucleico o una parte de este en sentido inverso con respecto a su promotor natural. Una transcripto antisentido de un ácido nucleico o de parte de este puede formar un dúplex con el ARNm que ocurre de forma natural mediante la especificación de la enzima y, de esta forma, evitar la acumulación de o la traducción del ARNm en la enzima activa. Otra posibilidad es el uso de ribozimas para inactivar un ácido nucleico. Los oligonucleótidos antisentido preferidos de acuerdo con la descripción presentan una secuencia de 6-50, en particular 10-30, 15-30 y 20-30, de nucleótidos contiguos al ácido nucleico objetivo y, preferentemente, son totalmente complementarios al ácido nucleico objetivo o a una parte de este.

En modalidades preferidas, el oligonucleótido antisentido hibrida con un terminal N o hacia el extremo 5' como un sitio de inicio de traducción, un sitio de inicio de transcripción, o un sitio de promotor. En modalidades adicionales, el oligonucleótido antisentido hibrida con una región 3' no traducida o el sitio de empalme del ARNm.

En una modalidad, un oligonucleótido de la presente descripción consiste de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o una combinación de estos, con el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido unidos entre sí mediante un enlace fosfodiéster. Estos oligonucleótidos pueden sintetizarse de forma convencional o pueden producirse recombinantemente.

En modalidades preferidas, un oligonucleótido de la descripción es un oligonucleótido "modificado". Aquí, el oligonucleótido puede modificarse de muchas formas distintas, sin afectar su capacidad de enlazamiento con su objetivo, para aumentar, por ejemplo, su estabilidad o su eficacia terapéutica. De acuerdo con la descripción, el término "oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido en el que (i) al menos dos de sus nucleótidos se unen entre sí mediante un enlace sintético entre nucleósidos (es decir, un enlace entre nucleótidos que no es un enlace fosfodiéster) y/o (ii) un grupo químico que normalmente no se encuentra en ácidos nucleicos se enlaza covalentemente al oligonucleótido. Los enlaces de internucleósidos sintéticos preferidos son fosforatioatos, fosfonatos de alquilo, fosforoditioatos, ésteres de fosfato, fosfonotioatos de alquilo, fosforamidatos, carbamatos, carbonates, triésteres de fosfato, acetamidatos, carboximetil ésteres y péptidos.

El término "oligonucleótido modificado" comprende, además, oligonucleótidos que tienen una base y/o un azúcar modificados covalentemente. Los "oligonucleótidos modificados" comprenden, por ejemplo, oligonucleótidos con residuos de azúcar que se unen covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular diferentes de un grupo hidroxilo en la posición 3' y a un grupo fosfato en la posición 5'. Los oligonucleótidos modificados pueden comprender, por ejemplo, un residuo de ribosa 2'-O-alquilado u otro azúcar en lugar de la ribosa, tal como arabinosa.

Debe entenderse que todas las modalidades descritas anteriormente con respecto a los oligonucleótidos pueden aplicarse, además, a polinucleótidos.

Por "ARN interferente pequeño" o "ARNip", como se usa en la presente, se entiende una molécula aislada de ARN, preferentemente, mayor de 10 nucleótidos de longitud, con mayor preferencia, mayor que 15 nucleótidos de longitud, y con la máxima preferencia, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud que se usa para identificar un gen objetivo o ARNm a degradarse. Un intervalo de 19-25 nucleótidos es el tamaño más preferido para los ARNip.

Los ARNip de acuerdo con la descripción pueden comprender ARN parcialmente purificado, ARN sustancialmente puro, ARN sintético o ARN producido recombinantemente, así como ARN alterado que se diferencia del ARN que ocurre de forma natural por la adición, deleción, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como al extremo/extremos del ARNip o a uno o más nucleótidos internos del ARNip; modificaciones que hacen al ARNip resistente a la digestión por la nucleasa (por ejemplo, el uso de ribonucleótidos sustituidos en 2' o modificaciones del esqueleto del azúcar-fosfato); o la sustitución de uno o más nucleótidos en el ARNip con desoxirribonucleótidos. Además, el ARNip puede modificarse para aumentar la estabilidad de este como se ha descrito anteriormente para oligonucleótidos modificados, en particular mediante la introducción de una o más uniones fosforotioato.

Una o ambas hebras del ARNip pueden comprender, además, un extremo 3' saliente. Como se usa en la presente, un "extremo 3'- saliente" se refiere al menos a un nucleótido no emparejado que se extiende desde el extremo de 3' de una hebra de ARN. Por consiguiente, en una modalidad, el ARNip comprende al menos un extremo 3' saliente de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos de longitud (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos), preferentemente, de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, con mayor preferencia, de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, y en particular, preferentemente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En la modalidad en la que ambas hebras de la molécula de ARNip comprenden un extremo 3' saliente, la longitud de los salientes puede ser igual o diferente para cada hebra. En una modalidad más preferida, el extremo 3' saliente se presenta en ambas hebras del ARNip, y es de 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra del ARNip de la descripción puede comprender extremos 3' salientes de ácido didesoxitimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

Para aumentar la estabilidad del ARNip, los extremos 3' salientes pueden estabilizarse, además, contra la degradación. En una modalidad, los salientes se estabilizan mediante la inclusión de nucleótidos purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, se tolera la sustitución de nucleótidos de pirimidina con análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de los nucleótidos de uridina en los extremos 3' salientes con 2' desoxitimidina y no afecta la eficiencia de la degradación del ARNi. En particular, la ausencia de 2'-hidroxilo en la 2' desoxitimidina aumenta significativamente la resistencia a la nucleasa del extremo 3' saliente en medios de cultivo de tejido.

Las hebras sentido y antisentido del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN de hebra única complementarias o pueden comprender una sola molécula en la que dos porciones complementarias se emparejan por las bases y se unen covalentemente por un área "horquilla" de hebra simple. Es decir, la región sentido y la región antisentido pueden conectarse covalentemente a través de una molécula de enlace. La molécula de enlace puede ser una molécula de enlace polinucleótido o no nucleótido. Sin querer limitarse a cualquier teoría, se cree que el área horquilla del último tipo de la molécula de ARNip se escinde intracelularmente por la proteína "Dicer" (o su equivalente) para formar un ARNip de dos moléculas de ARN individuales emparejadas por las bases.

Como se usa en la presente, el "ARNm objetivo" se refiere a una molécula de ARN que es el objetivo para la regulación negativa.

El ARNip puede expresarse a partir de los vectores de expresión pol III sin un cambio en el sitio objetivo, ya que se cree que la expresión de ARN a partir de los promotores pol III sólo es eficiente cuando el primer nucleótido transcrito es una purina.

El ARNip, de acuerdo con la descripción, puede dirigirse a cualquier tramo de los aproximadamente 19-25 nucleótidos contiguos de las secuencias objetivo del ARNm (la "secuencia objetivo"). Las técnicas para la selección de las secuencias diana para el ARNip se proporcionan, por ejemplo, en Tuschl T, y otros, "The siRNA User Guide", revisado el 11 de octubre de 2002. "The siRNA User Guide" está disponible en Internet en una página gestionada por el Dr. Thomas Tuschl, Laboratory of RNA Molecular Biology, Rockefeller University, New York, EE.UU., y puede encontrarse mediante el acceso a la página de la Rockefeller University y la búsqueda con la palabra clave "siRNA". De esta forma, la hebra sentido del presente ARNip comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a cualquier tramo contiguo de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos en el ARNm objetivo.

Generalmente, una secuencia objetivo en el ARNm objetivo puede seleccionarse a partir de una secuencia dada de ADNc que corresponde al ARNm objetivo, preferentemente, con el comienzo de 50 a 100 nt hacia 3' (es decir, en la dirección del extremo 3') desde el codón de inicio. Sin embargo, la secuencia objetivo puede situarse en las regiones 5' o 3' no traducidas, o en la región próxima al codón de inicio.

El ARNip puede obtenerse mediante el uso de varias técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, el ARNip puede sintetizarse químicamente o producirse recombinantemente mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, como el sistema in vitro con *Drosophila* descrito en la solicitud de EE.UU. publicada en US 2002/0086356 de Tuschl y otros.

Preferentemente, el ARNip se sintetiza químicamente mediante el uso de ribonucleósido-fosforamiditas protegidas adecuadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. El ARNip puede sintetizarse como dos moléculas separadas de ARN complementarias, o como una sola molécula de ARN con dos regiones complementarias.

Alternativamente, el ARNip puede expresarse, además, a partir de plásmidos de ADN lineales o circulares recombinantes mediante el uso de cualquier promotor adecuado. Dichas modalidades se incluyen de acuerdo con la presente descripción cuando se hace referencia en la presente descripción a la administración de ARNip o a la incorporación de ARNip en composiciones farmacéuticas. Los promotores adecuados para expresar el ARNip de la descripción a partir de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias del promotor U6 o H1 ARN pol III y el promotor citomegalovirus.

La selección de otros promotores adecuados forma parte de las habilidades del experto en la técnica. Los plásmidos recombinantes de la descripción pueden comprender, además, promotores inducibles o regulables para la expresión del ARNip en un tejido particular o en un entorno intracelular particular.

El ARNip expresado a partir de plásmidos recombinantes puede aislarse a partir de sistemas de expresión de células cultivadas mediante técnicas estándar, o puede expresarse intracelularmente. El uso de plásmidos recombinantes para suministrar ARNip a las células in vivo se discute en más detalle más abajo. El ARNip puede expresarse a partir de un plásmido recombinante como dos moléculas de ARN complementarias separadas, o como una sola molécula de ARN con dos regiones complementarias.

La selección de plásmidos adecuados para la expresión del ARNip, los métodos para la inserción de las secuencias de ácido nucleico para la expresión del ARNip en el plásmido, y los métodos para suministrar el plásmido recombinante en las células de interés forman parte de las habilidades del experto en la técnica.

El ARNip puede expresarse, además, a partir de vectores virales recombinantes intracelularmente in vivo. Los vectores virales recombinantes comprenden secuencias que codifican el ARNip y cualquier promotor adecuado para la expresión de las secuencias de ARNip. Los vectores virales recombinantes pueden comprender, además, promotores inducibles o regulables para la expresión del ARNip en un tejido particular o en un entorno intracelular particular. El ARNip puede expresarse a partir de un vector viral recombinante como dos moléculas de ARN separadas, complementarias, o como una sola molécula de ARN con dos regiones complementarias.

El término "péptido" comprende oligo- y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferentemente, 3 o más, preferentemente 4 o más, preferentemente 6 o más, preferentemente, 8 o más, preferentemente, 10 o más, preferentemente, 13 o más, preferentemente, 16 o más, preferentemente, 21 o más y hasta preferentemente, 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferentemente, a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y se usan de forma intercambiable en la presente descripción.

Preferentemente, las proteínas y péptidos descritos de acuerdo con la descripción han sido aislados. Los términos "proteína aislada" o "péptido aislado" significan que la proteína o el péptido han sido separados de su ambiente natural. Una proteína o un péptido aislado pueden estar en un estado purificado esencialmente. El término "purificado esencialmente" significa que la proteína o péptido está libre esencialmente de otras sustancias con las que se asocia de forma natural o in vivo.

Dichas proteínas y péptidos pueden usarse, por ejemplo, en la producción de anticuerpos y en un ensayo inmunológico o de diagnóstico o como agentes terapéuticos. Las proteínas y péptidos descritos de acuerdo con la invención pueden aislarse a partir de muestras biológicas tales como tejidos u homogenatos celulares y pueden expresarse, además, de forma recombinante en una multiplicidad de sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

Para el propósito de la presente descripción, "derivados" de una proteína o péptido o de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden fusiones del terminal amino y/o carboxilo y, además, inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia particular de aminoácidos. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio determinado de una secuencia de aminoácidos, aunque es posible, además, una inserción aleatoria con un tamizaje adecuado del producto resultante. Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por al menos la remoción de un residuo en la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre las proteínas o péptidos homólogos y/o para reemplazar aminoácidos con otros que tienen propiedades similares tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, electronegatividad, y volumen de la cadena lateral (sustitución conservadora). Las sustituciones conservadoras, por ejemplo, se refieren al intercambio de un aminoácido con otro aminoácido enumerado más abajo en el mismo grupo que el aminoácido que se va a sustituir:

1. residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)
2. residuos cargados negativamente y sus amidas: Asn, Asp, Glu, Gln

- 3. residuos cargados positivamente: His, Arg, Lys
- 4. residuos alifáticos grandes, no polares: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
- 5. residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

5 Debido a su parte particular en la arquitectura de la proteína, tres residuos se muestran entre paréntesis. Gly es el único residuo sin una cadena lateral y, por consiguiente, proporciona flexibilidad a la cadena. Pro tiene una geometría inusual que restringe grandemente la cadena. Cys puede formar un puente disulfuro.

10 Las variantes de aminoácido descritas anteriormente pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas de síntesis de péptidos conocidas tales como, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida (Merrifield, 1964) y métodos similares o mediante manipulación del ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para la preparación de proteínas y péptidos que tienen sustituciones, inserciones o deleciones, se describe en detalle en Sambrook y otros, (1989), por ejemplo.

15 Como se usa en la presente, los "derivados" de proteínas y péptidos comprenden, además, sustituciones, deleciones y/o adiciones simples o múltiples de cualquiera de las moléculas asociadas con la proteína o péptido, tales como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o péptidos. El término "derivado" se extiende, además, a todos los equivalentes químicos funcionales de dichas proteínas y péptidos.

20 De acuerdo con la presente descripción, una parte o fragmento de un antígeno asociado a tumor tiene, preferentemente, una propiedad funcional de la proteína o péptido del que se ha derivado. Dichas propiedades funcionales comprenden la interacción con anticuerpos, la interacción con otros péptidos o proteínas, la unión selectiva de ácidos nucleicos y una actividad enzimática. Una propiedad particular es la capacidad de formar un complejo con moléculas de CMH y, donde sea apropiado, generar una respuesta inmunitaria, preferentemente, mediante la estimulación de células citotóxicas o
25 células T cooperadoras. Una parte o fragmento de un antígeno asociado a tumor de la descripción comprende, preferentemente, una secuencia de al menos 6, en particular al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50, aminoácidos consecutivos del antígeno asociado a tumor. Una parte o fragmento de un antígeno asociado a tumor de la descripción comprende, preferentemente, una secuencia de hasta 8, en particular de hasta 10, de hasta 12, de hasta 15, de hasta 20, de hasta 30 o de hasta 55 aminoácidos consecutivos del antígeno
30 asociado a tumor. Una parte o fragmento de un antígeno asociado a tumor es preferentemente una parte del antígeno asociado a tumor que corresponde a la porción no transmembrana, en particular la porción extracelular del antígeno, o se comprende de estos.

35 Partes o fragmentos preferidas de un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la descripción son adecuados particularmente para la estimulación in vivo de linfocitos T citotóxicos pero, además, para la producción de linfocitos T amplificados y estimulados para la transferencia adoptiva terapéutica ex vivo.

40 Una parte o un fragmento de un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor se refiere, de acuerdo con la descripción, a la parte del ácido nucleico, que codifica al menos al antígeno asociado a tumor y/o para una parte o fragmento de dicho antígeno asociado a tumor, como se definió más arriba. Una parte o fragmento de un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor es, preferentemente, la parte del ácido nucleico que se corresponde con el marco abierto de lectura.

45 De acuerdo con la presente descripción, las modalidades particulares deberían implicar proporcionar proteínas o péptidos "dominantes negativos" derivados de antígenos asociados a tumor. Una proteína o péptido negativo dominante es una variante de proteína o péptido inactivo que, por medio de la interacción con la maquinaria celular, desplaza una proteína o péptido activo de su interacción con la maquinaria celular o que compite con la proteína o péptido activo, lo que reduce de esta manera el efecto de dicha proteína activa.

50 Los antisueros que contienen anticuerpos específicos que se enlazan específicamente a la proteína objetivo pueden prepararse mediante varios procesos estándares; ver, por ejemplo, "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" por Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9; "Antibodies: A Laboratory Manual" por Ed Harlow, David Lañe, ISBN: 0879693142 y "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" por Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN 0879695447. De esta manera es posible, además, generar anticuerpos afines y específicos que reconocen
55 proteínas complejas de la membrana en su forma nativa (Azorsa y otros, J. Immunol. Methods 229: 35-48, 1999; Anderson y otros, J. Immunol. 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, J. Immunol. Methods 234: 107-116, 2000). Esto es relevante especialmente para la preparación de los anticuerpos que se usan terapéuticamente, pero además para muchas aplicaciones de diagnóstico. En este sentido, es posible inmunizar con toda la proteína, con secuencias extracelulares parciales, así como con células que expresan la molécula objetivo en la forma fisiológicamente plegada.

60 Los anticuerpos monoclonales se preparan tradicionalmente mediante el uso de la tecnología de hibridoma. (Para detalles técnicos ver: "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" por Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19963722-9; "Antibodies: A Laboratory Manual" por Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142; "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" por Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447).

65

Se sabe que sólo una pequeña parte de una molécula del anticuerpo, el paratopo, se implica en el enlazamiento del anticuerpo a su epítipo (cf. con Clark, W.R. (1986), *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991), *Essential Immunology*, 7a Edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fe son, por ejemplo, efectoras de la cascada del complemento, pero no se implican en el enlazamiento del antígeno. Un anticuerpo del que se ha removido enzimáticamente la región pFc' o que ha sido producido sin la región pFc', denominada fragmento F(ab')₂, es portador de ambos sitios de enlazamiento del antígeno de un anticuerpo completo. De modo similar, un anticuerpo del que se ha removido enzimáticamente la región Fc o que ha sido producido sin dicha región Fc, denominada como fragmento Fab, es portador de un sitio de enlazamiento del antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Además, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera unida covalentemente de un anticuerpo y parte de la cadena pesada de dicho anticuerpo, denominada como Fd. Los fragmentos Fd son los determinantes principales de la especificidad del anticuerpo (un solo fragmento Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes, sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd, cuando se aislan, retienen la capacidad de enlazamiento a un epítipo.

Situadas dentro de la parte de unión a antígeno de un anticuerpo hay regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que interactúan directamente con el epítipo del antígeno y las regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) que mantienen la estructura terciaria del paratopo. Tanto el fragmento Fd de la cadena pesada y la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG contienen cuatro regiones marco (FR1 a FR4) que se separan en cada caso mediante tres regiones determinantes complementarias (CDR1 a CDR3). Las regiones CDR, y en particular, las regiones CDR3 y, aún con mayor particularidad, las regiones CDR3 de la cadena pesada son responsables en gran medida por la especificidad del anticuerpo.

Es sabido que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero pueden reemplazarse por regiones similares de anticuerpos con la misma o diferente especificidad, lo que retiene la especificidad por el epítipo del anticuerpo original. Esto hace posible el desarrollo de anticuerpos "humanizados" en los que las CDR no humanas se enlazan covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

Como otro ejemplo, el documento WO 92/04381 describe la producción y el uso de anticuerpos RSV murinos humanizados en los que al menos parte de las regiones FR murinas han sido reemplazadas con regiones FR de origen humano. Los anticuerpos de este tipo, lo que incluye fragmentos de anticuerpos intactos con capacidad de enlazamiento al antígeno, son denominados a menudo anticuerpos quiméricos.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" incluye, además, fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homologas humanas o no humanas, anticuerpos quiméricos con fragmentos F(ab')₂ en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homologas humanas o no humanas, anticuerpos quiméricos con el fragmento Fab en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homologas humanas o no humanas, y anticuerpos quiméricos con el fragmento Fd en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 han sido reemplazadas por secuencias homologas humanas o no humanas. El término "anticuerpo" comprende, además, anticuerpos de "cadena sencilla".

La presente descripción abarca, además, proteínas y péptidos que se unen específicamente a antígenos asociados a tumor. Las sustancias de enlazamiento de este tipo pueden proporcionarse, por ejemplo, mediante bibliotecas de péptidos degenerados que pueden prepararse simplemente en solución en una forma inmovilizada o como bibliotecas de despliegue en fagos. Es igualmente posible preparar bibliotecas combinatorias de péptidos con uno o más aminoácidos. Pueden prepararse, además, bibliotecas de residuos sintéticos peptoides y no peptídicos.

Los anticuerpos pueden acoplarse, además, a sustancias de diagnóstico específicas para que muestren las células y los tejidos que expresan los antígenos asociados a tumor. También pueden acoplarse a sustancias terapéuticas útiles.

Las sustancias de diagnóstico incluyen cualquiera de los marcadores que se usan para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primero o el segundo marcador, por ejemplo, FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) afectar la movilidad, por ejemplo, la movilidad electroforética, mediante carga, hidrofobicidad, forma, u otros parámetros físicos; o (iv) proporcionar un residuo de captura, por ejemplo, de afinidad, anticuerpo/antígeno, o formación de complejos iónicos. Adecuados como marcadores son estructuras, tales como marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores cromóforos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos, preferentemente marcadores isotópicos estables, marcadores isobáricos, marcadores enzimáticos, marcadores de partículas, en particular marcadores de partículas metálicas, marcadores de partículas magnéticas, marcadores de partículas poliméricas, moléculas orgánicas pequeñas como la biotina, ligandos de receptores o de moléculas de enlazamiento tales como proteínas de adhesión celular o lecitinas, secuencias de marcadores que comprenden ácidos nucleicos y/o residuos de aminoácidos que pueden detectarse mediante el uso de agentes de enlazamiento, etcétera. Las sustancias de diagnóstico comprenden, en una forma no limitante, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y de radiodiagnóstico, que incluyen los emisores de positrones tales como flúor 18 y carbono 11, emisores gamma tales como el yodo 123, tecnecio 99m, yodo 131 e indio 111, nucleidos para resonancia magnética nuclear, tales como flúor y gadolinio.

Como se usa en la presente, el término "sustancia útil terapéuticamente" significa cualquier molécula que pueda ejercer un efecto terapéutico. De acuerdo con la presente descripción, Una sustancia útil terapéuticamente se guía, preferentemente, de forma selectiva a una célula que expresa uno o más antígenos asociados a tumor e incluye agentes anticancerígenos, compuestos marcados con yodo radioactivo, toxinas, fármacos citostáticos o citolíticos, etcétera. Los agentes contra el cáncer comprenden, por ejemplo, aminoglutetimida, azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfano, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabidina, dacarbacina, dactinomina, daunorrubicina, doxorubicina, taxol, etopósido, fluorouracilo, interferon- α , lomustina, mercaptopurina, metotrexato, mitotano, procarbacia HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina. Otros agentes contra el cáncer se describen, por ejemplo, en Goodman y Gilman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 8a edición, 1990, McGraw-Hill Inc., en particular el Capítulo 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner). Las toxinas pueden ser proteínas como la proteína antiviral de la hierba carmín, la toxina del cólera, la toxina pertussis, la ricina, la gelonina, la abrina, la exotoxina diftérica o exotoxina de *Pseudomonas*. Los residuos de toxinas también pueden ser radionúclidos emisores de gran energía como el cobalto-60.

El término "complejo mayor de histocompatibilidad" o "CMH" se refiere a un complejo de genes presentes en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas de CMH se implican en la señalización entre los linfocitos y las células presentadoras de antígeno en las reacciones inmunitarias normales mediante el enlazamiento de péptidos y los presenta para el reconocimiento por los receptores de las células T (RCT). Las moléculas de CMH enlazan péptidos en un compartimento de procesamiento intracelular y presentan estos péptidos en la superficie de las células presentadoras de antígenos para el reconocimiento por las células T. La región CMH humana también denominada HLA se encuentra en el cromosoma 6 e incluye la región de clase I y clase II. En una modalidad preferida de todos los aspectos descritos en la presente, una molécula de CMH es una molécula de HLA.

"Reducir" o "inhibir" tal como se usa en la presente descripción significa la capacidad de provocar una disminución total, preferentemente, del 20 % o superior, con mayor preferencia, del 50 % o superior, y con la máxima preferencia, del 75 % o superior, por ejemplo, en el nivel de proteína o de ARNm en comparación con una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra no tratada con ARNi). Esta reducción o inhibición de la expresión de ARN o proteína puede ocurrir a través de la escisión o degradación del ARNm objetivo. Los ensayos para la expresión de proteína o la expresión de ácido nucleico son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos ELISA, análisis de transferencia tipo Western para la expresión de proteínas, y de transferencia tipo Northern o ensayos de protección frente a la ARNasa para el ARN.

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

"Expresión anormal" significa, de acuerdo con la descripción, que la expresión está alterada, preferentemente, aumentada, en comparación con el estado en un individuo sano.

De acuerdo con la descripción, el término "aumento" o "cantidad aumentada" se refiere, preferentemente, a un aumento de al menos el 10 %, en particular de al menos el 20 %, al menos el 50 % o al menos el 100 %. La cantidad de una sustancia se aumenta, además, en una muestra de prueba, tal como en una muestra biológica, en comparación con una muestra de referencia si es detectable en la muestra de prueba, pero está ausente o no es detectable en la muestra de referencia.

Como se usa en la presente, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico en el que los antígenos asociados a tumor se expresan o expresan anormalmente. "Expresión anormal" significa, de acuerdo con la descripción, que la expresión está alterada, preferentemente, aumentada, en comparación con el estado en un individuo sano. Un aumento de la expresión se refiere a un aumento de al menos el 10 %, en particular al menos el 20 %, al menos el 50 % o al menos el 100 %. En una modalidad, el antígeno asociado a tumor se expresa sólo en el tejido de un individuo enfermo, mientras que la expresión en un individuo sano está reprimida. Un ejemplo de dicha enfermedad es el cáncer, en donde el término "cáncer", de acuerdo con la descripción, comprende leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer rectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer adrenal, cáncer de tiroides, cáncer de células sanguíneas, cáncer de piel, cáncer cerebral, cáncer cervical, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de nódulos linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT, por sus siglas en inglés), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y metástasis de estos. Los ejemplos de estos son carcinomas de pulmón, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas de colon, carcinomas de células renales, carcinomas cervicales, o metástasis de los tipos de cáncer o tumores descritos anteriormente. El término cáncer de acuerdo con la presente descripción comprende, además, metástasis del cáncer.

Por "tumor" se entiende un grupo anómalo de células o tejidos que crece mediante una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa en crecimiento después de que los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento cesan. Los tumores presentan una falta parcial o completa de organización estructural y de coordinación funcional con el tejido normal, y normalmente forman una masa de tejido distinta, que puede ser tanto benigna como maligna.

65

Por "metástasis" se entiende la propagación de las células cancerosas desde su lugar original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, invasión de la matriz extracelular, penetración de las membranas basales del endotelio para penetrar en la cavidad y en los vasos del cuerpo, y después, tras haber sido transportadas por la sangre, la infiltración en los órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el lugar objetivo depende de la angiogénesis. Frecuentemente, la metástasis del tumor ocurre incluso después de la remoción del tumor primario ya que las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la descripción se refiere a "metástasis distante" que se relaciona con una metástasis que se halla remota del tumor primario y del sistema de nódulos linfáticos regional.

De acuerdo con la presente descripción, una muestra biológica puede ser una muestra de tejido, que incluye fluidos corporales, y/o una muestra celular y puede obtenerse de forma convencional tal como mediante una biopsia de tejido, que incluye una biopsia por punción, y mediante la extracción de sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales. Como se usa en la presente, el término "muestra biológica" incluye, además, fracciones de muestras biológicas.

Como se usa en la presente, el término "célula inmunorreactiva" significa una célula que puede madurar hasta una célula inmunitaria (tal como linfocitos B, linfocitos T cooperadores, o linfocito T citolítico) con una estimulación adecuada. Las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34⁺, células T inmaduras y maduras y células B inmaduras y maduras. Si se desea una producción de células citolíticas o de células T cooperadoras que reconozcan un antígeno asociado a tumor, la célula inmunorreactiva se pone en contacto con una célula que expresa un antígeno asociado a tumor en unas condiciones que favorezcan la producción, diferenciación y/o selección de células T citolíticas y de células T cooperadoras. La diferenciación de los precursores de células T en células T citolíticas, cuando se exponen a un antígeno, es similar a la selección clonal del sistema inmunitario.

Los términos "células T" y "linfocitos T" se usan de forma intercambiable en la presente descripción e incluyen células T cooperadoras y células T citotóxicas, que comprenden células T citolíticas.

Algunos métodos terapéuticos se basan en una reacción del sistema inmunitario de un paciente, que resulta en una lisis de las células presentadoras de antígenos, tales como las células cancerosas que presentan uno o más antígenos asociados a tumor. En esta conexión, por ejemplo, los linfocitos T citotóxicos autólogos específicos para un complejo de antígeno asociado a tumor y una molécula del CMH, se administran a un paciente que presenta una anomalía celular. La producción *in vitro* de dichos linfocitos T citotóxicos es conocida. Un ejemplo de un método de diferenciación de células T puede encontrarse en el documento WO-A-9633265. Generalmente, se toma una muestra que contiene células, tales como células sanguíneas, del paciente y las células se ponen en contacto con una célula que presenta el complejo y que puede provocar la propagación de linfocitos T citotóxicos (por ejemplo, células dendríticas). La célula objetivo puede ser una célula transfectada, tal como una célula COS. Estas células transfectadas presentan el complejo deseado en su superficie y, cuando contactan con los linfocitos T citotóxicos, estimulan su propagación. Después, los linfocitos T citotóxicos autólogos expandidos clonalmente se administran al paciente.

En otro método para la selección de linfocitos T citotóxicos específicos para el antígeno, se usan tetrámeros fluorogénicos de complejos de molécula de clase I del CMH/péptido para obtener clones específicos de linfocitos T citotóxicos (Altman y otros, *Science* 274:94-96, 1996; Dunbar y otros, *Curr. Biol.* 8:413-416, 1998).

La presente descripción incluye, además, métodos terapéuticos denominados como transferencia adoptiva (Greenberg, *J. Immunol.* 136(5):1917, 1986; Riddell y otros, *Science* 257:238, 1992; Lynch y otros, *Eur. J. Immunol.* 21:1403-1410, 1991; Kast y otros, *Cell* 59:603-614, 1989), en donde las células que presentan el complejo deseado (por ejemplo, células dendríticas) se combinan con los linfocitos T citotóxicos del paciente a tratarse, lo que resulta en una propagación de linfocitos T citotóxicos específicos. Después, los linfocitos T citotóxicos propagados se administran a un paciente que presenta una anomalía celular que se caracteriza por determinadas células anómalas que presentan el complejo específico. Después, los linfocitos T citotóxicos lisan las células anómalas, lo que consigue de esta forma un efecto terapéutico deseado.

Además, las células que presentan el complejo deseado (por ejemplo, células dendríticas) pueden combinarse con linfocitos T citotóxicos de individuos sanos o de otras especies (por ejemplo, ratones) que puede resultar en la propagación de linfocitos T citotóxicos específicos con una afinidad elevada. El receptor de células T de elevada afinidad de estos linfocitos T específicos propagados puede clonarse y opcionalmente humanizarse a un alcance diferente, y después los receptores de células T obtenidos de esta forma se transducen a través de un gen de transferencia, por ejemplo, mediante el uso de vectores retrovirales, en células T de pacientes. Después, puede llevarse a cabo la transferencia adoptiva mediante el uso de estos linfocitos T alterados genéticamente (Stanislowski y otros, *Nat Immunol.* 2: 962-70, 2001; Kessels y otros, *Nat Immunol.* 2: 957-61, 2001).

La transferencia adoptiva no es la única forma de terapia que puede aplicarse de acuerdo con la descripción. Los linfocitos T citotóxicos pueden generarse, además, *in vivo* en una manera conocida per se. Un método usa células no proliferativas que expresan el complejo. Las células que se usan en este caso serán aquellas que normalmente expresan el complejo, tales como células de tumor irradiadas o células transfectadas con uno o más genes necesarios para la presentación del

complejo (es decir, el péptido antigénico y la molécula presentadora del CMH). Otra forma preferida es la introducción del antígeno asociado a tumor en la forma de ARN recombinante que puede introducirse en las células, por ejemplo, mediante transferencia liposomal o mediante electroporación. Las células resultantes presentan el complejo de interés y son reconocidas por los linfocitos T citotóxicos autólogos que después se propagan.

5 Puede alcanzarse un efecto similar mediante la combinación del antígeno asociado a tumor o un fragmento de este con un adyuvante para hacer posible la incorporación *in vivo* en las células presentadoras de antígeno. El antígeno asociado a tumor o un fragmento de este puede representarse como una proteína, como ADN (por ejemplo, dentro de un vector) o como ARN. El antígeno asociado a tumor se procesa para producir un complemento del péptido para la molécula del CMH, mientras un fragmento de este puede presentarse sin la necesidad de un procesamiento adicional. Este último es el caso en particular, si estos pueden unirse a las moléculas del CMH. Resultan preferidas las formas de administración en las que el antígeno completo se procesa *in vivo* por una célula dendrítica, ya que esto también produce respuestas de las células T cooperadoras que son necesarias para una respuesta inmunitaria eficaz (Ossendorp y otros, Immunol Lett. 74:75-9, 2000; Ossendorp y otros, J. Exp. Med. 187:693-702, 1998). En general, es posible administrar una cantidad eficaz del antígeno asociado a tumor a un paciente, por ejemplo, mediante inyección intradérmica. Sin embargo, la inyección también puede realizarse intranodalmente en un nódulo linfático (Maloy y otros, Proc Natl Acad Sci USA 98:3299-303, 2001).

20 Las composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para la inmunización o vacunación para tratar terapéuticamente o prevenir una enfermedad descrita en la presente. De acuerdo con la descripción, los términos "inmunización" o "vacunación" se refieren, preferentemente, a un incremento en o activación de una respuesta inmunitaria a un antígeno. Es posible usar modelos animales para analizar un efecto inmunizante sobre el cáncer mediante el uso de un antígeno asociado a tumor o un ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, las células cancerosas humanas pueden introducirse en un ratón para generar un tumor, y pueden administrarse uno o más ácidos nucleicos que codifican para antígenos asociados a tumor. El efecto sobre las células cancerosas (por ejemplo, reducción del tamaño del tumor) puede medirse como una medida de la eficacia de una inmunización mediante el ácido nucleico.

30 Como parte de la composición para una inmunización o vacunación, preferentemente, se administran uno o más antígenos asociados al tumor o fragmentos de estos estimulados conjuntamente con uno o más adyuvantes para inducir una respuesta inmunitaria o para aumentar una respuesta inmunitaria. Un adyuvante es una sustancia que se incorpora al antígeno o que se administra conjuntamente con este último y que aumenta la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmunitaria al proporcionar un depósito de antígeno (extracelularmente o en macrófagos), mediante la activación de macrófagos y/o la estimulación de determinados linfocitos. Los adyuvantes son conocidos y comprenden, de manera no limitativa, monofosforil lípido A (MPL, SmithKline Beecham), saponinas tales como la QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; documento WO 96/33739), la QS7, la QS17 la QS18 y la QS-L1 (So y otros, Mol. Cells 7: 178-186, 1997), adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, vitamina E, montanide, alumbre, oligonucleótidos CpG (Kreig y otros, Nature 374:546-9, 1995) y varias emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites degradables biológicamente tales como el escualeno y/o tocoferol. Preferentemente, los péptidos se administran en una mezcla con DQS21/MPL. La proporción de DQL21 con respecto a MPL es habitualmente de aproximadamente 1:10 a 10:1, preferentemente, de aproximadamente 1:5 a 5:1 y en particular de aproximadamente 1:1. Para la administración en humanos, una formulación de vacuna contiene típicamente DQS21 y MPL en un intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg.

45 Pueden administrarse, además, otras sustancias que estimulan una respuesta inmunitaria del paciente. Es posible, por ejemplo, usar citocinas en una vacunación, debido a sus propiedades reguladoras sobre los linfocitos. Dichas citocinas comprenden, por ejemplo, interleucina-12 (IL-12) que ha demostrado que aumenta las acciones protectoras de las vacunas (cf. Science 268:1432-1434, 1995), GM-CSF e IL-18.

50 Existe una cantidad de compuestos que aumentan la respuesta inmunitaria y que, por consiguiente, pueden usarse en una vacunación. Dichos compuestos comprenden moléculas coestimuladoras proporcionadas en la forma de proteínas o ácidos nucleicos tales como B7-1 y B7-2 (CD80 y CD86, respectivamente).

55 La presente descripción proporciona, además, péptidos y proteínas para la administración de ácidos nucleicos. Las proteínas y péptidos pueden administrarse de una manera conocida per se. En una modalidad, los ácidos nucleicos se administran mediante procedimientos *ex vivo*, es decir, mediante la extracción de células de un paciente, la modificación genética de dichas células para incorporar un antígeno asociado a tumor y la reintroducción en el paciente de las células alteradas. Esto generalmente comprende la introducción *in vitro* de una copia funcional de un gen en las células de un paciente y la reintroducción de las células alteradas genéticamente en el paciente. La copia funcional del gen está bajo el control funcional de elementos reguladores que permiten que el gen se exprese en las células alteradas genéticamente. Los procedimientos de transfección y transducción son conocidos por el experto en la materia. La presente descripción proporciona, además, ácidos nucleicos para la administración *in vivo* mediante el uso de vectores, tales como virus y liposomas con control de objetivo. Si de acuerdo con la descripción se hace referencia a la administración o incorporación en composiciones farmacéuticas de ácidos nucleicos esto incluye modalidades en donde el ácido nucleico se presenta en dichos vectores.

En una modalidad preferida, se selecciona un virus o un vector viral para la administración de un ácido nucleico que codifica para un antígeno asociado a tumor del grupo que consiste en adenovirus, virus asociados a adenovirus, pox virus, que incluyen el virus vaccinia y pox virus atenuados, virus Semliki Forest, retrovirus, virus Sindbis y partículas similares a los Virus Ty. En especial, se da particular preferencia a los adenovirus y los retrovirus. Los retrovirus son típicamente deficientes para la replicación (es decir, son incapaces de generar partículas infecciosas).

Los métodos para la introducción *in vitro* o *in vivo* de ácidos nucleicos en las células comprende la transfección de ácidos nucleicos precipitados por fosfato cálcico, la transfección de ácidos nucleicos asociados con DEAE, transfección o infección con los virus indicados anteriormente que portan los ácidos nucleicos de interés, y la transfección mediada por liposomas. En modalidades particulares, se da preferencia a dirigir el ácido nucleico a células particulares. En dichas modalidades, el portador usado para la administración de un ácido nucleico en una célula (por ejemplo, un retrovirus o un liposoma) puede presentar una molécula control unida al objetivo. Por ejemplo, puede incorporarse una molécula, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie en la célula objetivo o un ligando para un receptor de la célula objetivo en el interior o unido al portador de ácido nucleico. Los anticuerpos preferidos comprenden anticuerpos que se unen selectivamente a un antígeno asociado a tumor. Si se desea la administración de un ácido nucleico a través de liposomas, pueden incorporarse proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie asociada con la endocitosis en la formulación del liposoma para hacer posible el control y/o la captación del objetivo. Dichas proteínas comprenden proteínas de la cápsida o fragmentos de estas que son específicos para un tipo particular de células, anticuerpos para proteínas que se internalizan, y proteínas que se dirigen a un sitio intracelular.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse en preparaciones compatibles farmacéuticamente. Dichas preparaciones pueden contener usualmente concentraciones compatibles farmacéuticamente de sales, sustancias tampón, conservantes, portadores, lo que complementa las sustancias que aumentan la inmunidad tales como los adyuvantes, por ejemplo, oligonucleótidos CpG, citocinas, quimiocinas, saponinas, GM-CSF y/o ARN y, cuando sea apropiado, otros compuestos activos terapéuticamente.

Los compuestos activos terapéuticamente pueden administrarse mediante una de las vías convencionales, lo que incluye la inyección o la infusión. La administración puede llevarse a cabo, por ejemplo, oralmente, intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente o transdérmicamente. Preferentemente, los anticuerpos se administran terapéuticamente mediante un aerosol pulmonar. Los ácidos nucleicos antisentido se administran preferentemente mediante administración intravenosa lenta.

Las composiciones descritas en la descripción se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que alcanza una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una afección particular caracterizada mediante la expresión de uno o más antígenos asociados a tumor, la reacción deseada se relaciona, preferentemente, con la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una condición puede ser, además, un retraso en la aparición o la prevención de la aparición de dicha enfermedad o de dicha condición. De acuerdo con la descripción, un diagnóstico o tratamiento de un cáncer puede incluir, además, el diagnóstico o el tratamiento de la metástasis del cáncer que ya se ha formado o se formará. De acuerdo con la descripción, el término "tratamiento" comprende el tratamiento terapéutico y profiláctico, es decir, la prevención.

Una cantidad eficaz de una composición de la descripción dependerá de la condición a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, lo que incluye la edad, la condición fisiológica, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de la terapia de acompañamiento (si está presente), la vía específica de administración y factores similares.

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

Las dosis administradas de las composiciones de la descripción pueden depender de varios parámetros, tales como el tipo de administración, la condición del paciente, el periodo de administración deseado, etcétera. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, pueden usarse dosis más altas (o dosis eficazmente mayores alcanzadas por una vía de administración diferente, más localizada).

Generalmente, las dosis del antígeno asociado a tumor de 1 ng a 1 mg, preferentemente, de 10 ng a 100 µg, se formulan y se administran para un tratamiento o para generar o incrementar una respuesta inmunitaria. Si se desea la administración de ácidos nucleicos (ADN y ARN) que codifican para los antígenos asociados a tumor, se formulan y administran dosis de 1 ng a 0,1 mg.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción se administran generalmente en cantidades compatibles farmacéuticamente y en composiciones compatibles farmacéuticamente. El término "compatible farmacéuticamente" 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 usualmente sales, sustancias tampón, conservantes, portadores y, cuando sea apropiado, otros compuestos activos terapéuticamente. Cuando se usan en medicina, las sales deberían ser

compatibles farmacéuticamente. Sin embargo, las sales que no son compatibles farmacéuticamente pueden usarse para preparar sales compatibles farmacéuticamente y se incluyen en la descripción. Las sales compatibles farmacológicamente y farmacéuticamente de este tipo comprenden de manera no limitativa, aquellas preparadas a partir de los ácidos siguientes: ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, y succínico. Las sales compatibles farmacéuticamente pueden prepararse, además, como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

Una composición farmacéutica puede comprender un portador compatible farmacéuticamente. Como se usa en la presente, el término "portador compatible farmacéuticamente" se refiere a uno o más agentes de relleno sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias de encapsulación compatibles, que son adecuados para su administración en humanos. El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina con el fin de facilitar la aplicación. Los componentes de la composición farmacéutica de la descripción son usualmente tales que no se produce interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden contener sustancias tampón adecuadas tales como ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener, además, cuando sea apropiado, conservantes adecuados tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y tiomerosal.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan usualmente en una forma de dosificación uniforme y pueden prepararse de una forma conocida per se. Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden estar, por ejemplo, en forma de cápsulas, comprimidos, tabletas, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires o, en la forma de una emulsión.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden usualmente una preparación estéril acuosa o no acuosa del componente activo, que es, preferentemente, isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de portadores y disolventes compatibles son la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Adicionalmente, se usan aceites fijados, usualmente estériles, como solución o medio de suspensión.

La presente invención se describe en detalle mediante las figuras y los ejemplos más abajo, que se usan sólo para propósitos ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Debido a la descripción y los ejemplos, las modalidades adicionales son accesibles igualmente para el trabajador experto.

Figuras:

Figura 1. Expresión del ARNm de ISC-468

A. Investigaciones por RT-PCR con los cebadores específicos de ISC-468 no mostraron una expresión significativa en todos los tejidos normales ensayados a excepción de la placenta.

B. Expresión del ARNm de ISC-468 en los carcinomas de cabeza y cuello, hígado, riñón y colon.

C. Expresión del ARNm de ISC-468 en los carcinomas de mama, ovario y estómago.

Figura 2. Análisis por PCR cuantitativo de la expresión del ARNm de ISC-468 en tejido control normal y en cánceres de mama. La PCR en tiempo real con cebadores específicos de ISC-468 mostró una expresión selectiva del ARNm en testículos, placenta, estómago y PBMC normales, y en todas las biopsias del carcinoma de mama.

Figura 3. Expresión del ARNm de ISC-468

(A) RT-PCR y (B) PCR en tiempo real (la investigación con los cebadores específicos de ISC-468 mostró una expresión selectiva del ARNm en testículos y placenta normales y en el 80 % de las biopsias de carcinoma de mama).

Figura 4. Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de ISC-468

(A) La especificidad de los anticuerpos anti-ISC-468 se confirmó por tinción de células transfectadas con ISC-468-eGFP. (B) Tinción de las células fijadas con MeOH tanto transfectadas con dúplex de ARNi específicos de ISC-468, o dúplex de control no silenciadas. (C) Tinción de las células no fijadas tanto transfectadas con dúplex específicos de ARNi de ISC-468, o dúplex de control no silenciadas.

Figura 5. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de ISC-468

No se detectó ninguna expresión en tejido mamario normal (A) 100x, (B) 200x. Por el contrario, se observó una tinción fuerte y homogénea de la membrana en los especímenes de carcinoma de mama (C) 100x, (D) 200x.

Figura 6. Silenciamiento inducido por ARNi de la expresión del ARNm de ISC-468

La transfección de células con los dúplex de ARNip específicas para ISC-468 resultó en una inhibición perceptible de la expresión del ARNm de ISC-468 en comparación con las células control.

5 Figura 7. Análisis de la proliferación celular

La transfección de células con dúplex de ARNip específicos para ISC-468 resultó en una alteración perceptible de la proliferación celular en comparación con las células control.

10 Figura 8. Análisis del ciclo celular

La transfección de células con dúplex de ARNip específicos para ISC-468 resultó en la parada en G1/S de las células de carcinoma de mama (A) MCF-7 y (B) BT-549 en comparación con las células control.

15 Figura 9. Fosforilación de AKT

La transfección de células con dúplex de ARNip específicos para ISC-468 resultó en una alteración perceptible de la fosforilación de AKT en comparación con las células control.

20 Figura 10. Inhibición de la proliferación mediada por anticuerpo

La incubación de células MCF-7 de carcinoma de mama con anticuerpos específicos para ISC-468 resultó en una proliferación reducida en comparación con las células incubadas con un anticuerpo control irrelevante.

25 Figura 11. Análisis de la proliferación celular

La transfección de células con dúplex de ARNip específicos para ISC-468 resultó en una alteración perceptible de (A) quimiotaxis, (B) quimiocinesis, e (C) invasión en comparación con las células control.

30 Figura 12. Correlación con receptor de estrógenos

Los niveles de expresión del ARNm de ISC-468 en las muestras de carcinoma de mama se correlaciona con el estado del receptor del estrógeno. Se muestran la media, los percentiles 10^{mo}, y 90 con barras de error.

35 Figura 13. Tratamiento con 17β-estradiol,

se indujo la expresión del ARNm de ISC-468 mediante el tratamiento del receptor del estrógeno en líneas celulares positivas de cáncer de mama MCF-7 con 17β-estradiol 100 nM. No se observó inducción del receptor de estrógenos en la línea celular negativa MDA-MB-231.

40 Figura 14. Secuencias

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

45 **EJEMPLOS:**

Material y métodos

50 Las técnicas y métodos mencionados en la presente descripción se han llevado a cabo de la forma conocida per se y se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos los métodos, lo que incluye el uso de kits y reactivos, se han llevado a cabo de acuerdo con la información de los fabricantes.

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

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

60 Se llevó a cabo la síntesis de la primera hebra de ADNc a partir de 4 µg de ARN total en una mezcla de reacción de 20 µl por medio de Superscript II (Invitrogen), de acuerdo con la información del fabricante. El cebador usado fue un oligonucleótido dT(18). Se revisaron la integridad y calidad del ADNc mediante amplificación de p53 en una PCR de 30 ciclos ((sec. con núm. de ident.: 33,34), temperatura de hibridación 67 °C).

65 Se preparó un archivo de la primera hebra de ADNc a partir de una cantidad de tejidos normales y de entidades tumorales. Para los estudios de expresión, se amplificaron 0,5 µl de estos ADNc en una mezcla de reacción de 30 µl, mediante el

5 uso de cebadores específicos para GOI (ver más abajo) y 1 U de ADN polimerasa HotStartTaq (Qiagen). Cada mezcla de reacción contenía dNTP 150 μ M, 0,3 μ M de cada cebador y 3 μ l de tampón de reacción 10 x. Los cebadores se seleccionaron de forma que se situasen en dos exones diferentes, y se confirmó la eliminación de la interferencia por contaminación del ADN genómico como la razón para los resultados falso-positivos mediante la evaluación del ADN transcrito no reversible como patrón. Después de 15 minutos a 95 °C para activar la ADN polimerasa de HotStartTaq, se realizaron 35 ciclos de PCR (0,5 minutos a 94 °C, 0,5 minutos a la temperatura de hibridación particular, 0,5 minutos a 72 °C y una elongación final a 72 °C durante 6 minutos). Se fraccionaron 20 μ l de esta reacción y se analizaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

10 Preparación de ADNc cebado con hexámero aleatorio y PCR cuantitativo en tiempo real

15 Se cuantificó la expresión de varios genes mediante PCR en tiempo real. Los productos de la PCR se detectaron mediante el uso de SYBR Green como colorante marcador intercalado. La fluorescencia reportada de SYBR Green se suprime en la solución y el colorante es activo sólo después de la unión a los fragmentos de ADN de doble hebra. El aumento en la fluorescencia de SYBR Green como resultado de la amplificación específica mediante el uso de cebadores específicos para GOI después de cada ciclo de PCR se usa para la cuantificación. La expresión del gen objetivo se cuantifica absolutamente o con relación a la expresión de un gen control con una expresión constante en los tejidos que deben investigarse. La expresión se midió después de la estandarización de las muestras frente a ARN 18s denominado gen de mantenimiento mediante el uso del método $\Delta\Delta$ -Ct_t (PE Biosystems, EE.UU.). Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado y se determinaron por triplicado. Se usó el kit PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Hilden) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó con cebadores aleatorios (Invitrogen) mediante el uso del protocolo descrito anteriormente. Para la PCR, se empleó cada porción de 5 μ l del ADNc diluido en un volumen total de 30 μ l: cebador sentido 300 nM, cebador antisentido 300 nM; desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos; 95 °C durante 30 segundos; anillado durante 30 segundos; 72 °C durante 30 segundos; 40 ciclos. Los cebadores usados se indican en los ejemplos respectivos, su secuencia de nucleótidos se muestra en la figura 14 y en el protocolo de secuencia asociado con la presente patente.

Análisis de clonación y secuencia

30 La clonación de los genes completos y de los fragmentos de genes tuvo lugar mediante métodos convencionales. Para determinar la secuencia, se amplificaron los antígenos correspondientes mediante el uso de la polimerasa pfu de comprobación (Stratagene). Después de la terminación de la PCR, se ligó la adenosina por medio de la ADN polimerasa de HotStartTaq a los extremos del amplicón para clonar los fragmentos en el vector TOPO-TA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo por un servicio comercial. Las secuencias se analizaron mediante el uso de programas y algoritmos de predicción convencionales.

Análisis de la proliferación celular

40 Después de 24 horas de la transfección con los dúplex de ARNip, se cultivaron 1×10^4 células en un medio suplementado con varias concentraciones de FCS durante 48 horas. Se analizó la proliferación mediante la medición de la incorporación de BrdU en las hebras de ADN acabadas de sintetizar mediante el uso del kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador multietiquetas Wallac Victor2 (Perkin Elmer).

Análisis del ciclo celular y apoptosis

45 Las células se cultivaron en un medio suplementado con FCS en varias concentraciones, se recogieron después de 48 horas y se tiñeron con yoduro de propidio antes del análisis del contenido de ADN por citometría de flujo. Las células apoptóticas y las células en fases S/G2/M del ciclo celular se cuantificaron mediante el uso de CellQuest-Software (Becton Dickinson).

Migración celular

50 Los ensayos de migración celular se realizaron en cámaras transpocillo con membranas porosas de 8,0 μ m (BD Biosciences) con células cultivadas en un medio sin suero durante 12 horas antes de los experimentos. Para los experimentos de ARNip, las células se transfirieron a condiciones sin suero 24 horas después de la transfección con duplas de ARNip como se describió anteriormente. Se añadieron 4×10^4 células en 400 μ l de un medio de cultivo sin suero en la cámara superior. Las cámaras inferiores contenían 800 μ l de medio de cultivo suplementado con FCS, PDGF-BB (Sigma-Aldrich) o SDF-1 α /CXCL12 (R&D Systems) como quimioatrayentes. Después de 24 horas, las células que habían migrado a la parte inferior de la membrana se fijaron en metanol helado; las membranas se escindieron, se colocaron en láminas portaobjetos de microscopio y se montaron con Hoechst (Dako) para microscopía de fluorescencia. Se contaron las células por cada membrana en cinco campos visuales aleatorios (amplificación 100x). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se analizaron los efectos de la quimioquinesis de las células mediante el uso de la misma configuración experimental con (i) sin adición de quimioatrayente tanto a la cámara superior como a la inferior y (ii) con adición de quimioatrayente tanto a la cámara superior como a la inferior.

Ensayo de invasión in vitro

Los ensayos de invasión in vivo se realizaron en cámaras transpocillos con membranas porosas de 8,0 µm (BD Biosciences) con células cultivadas en un medio sin suero durante 12 horas antes del experimento. Las cámaras superiores se prepararon con 100 µl de Matrigel (BD Biosciences) diluido a 1 mg/ml en un medio sin suero. Las cámaras se incubaron a 37 °C durante 5 horas para la gelificación. Para los experimentos de ARNip, las células se transfirieron a condiciones sin suero 24 horas después de la transfección con duplas de ARNip como se describió anteriormente. Se añadieron 1x10⁵ células en 400 µl de un medio de cultivo sin suero en la cámara superior. Las cámaras inferiores contenían 800 µl de medio de cultivo suplementado con FCS como quimioatrayente. Después de 24 horas, las células que habían migrado a la parte inferior de la membrana se fijaron en metanol helado; las membranas se escindieron, se colocaron en portaobjetos de microscopio y se montaron con Hoechst (Dako) para microscopía de fluorescencia. Se contaron las células por cada membrana en cinco campos visuales aleatorios (amplificación 100x). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Ejemplo 1: Identificación de ISC-468 como objetivo en la terapéutica y diagnóstico del cáncer

ISC-468 (sec. con núm. de ident.: 1) codifica una proteína de 212 aminoácidos (sec. con núm. de ident.: 2) y con un peso molecular de 23,6 kDa. Se ha descrito previamente como un antígeno específico de tejido (Cocchia y otros, Genomics 68:305-312, 2000) y como una proteína específica de la placenta que se expresa durante el embarazo (Fant y otros, Mol Reprod Dev. 63:430-6, 2002). La técnica anterior sugiere el uso de antígenos específicos de tejido para la vacunación contra el cáncer (Pardoll Nature Medicine Vaccine Supplement 4:525-531, 1998).

Se ha pronosticado que la proteína presenta un péptido señal de escisión desde aa 1-23, seguido de un dominio transmembrana putativo corto (aa 25-47) como se analizó con herramientas de bioinformática (TMPred, SOUSI). Se ha pronosticado que el resto de la proteína es extracelular y, por consiguiente, puede usarse, de acuerdo con la invención, como estructura objetivo para los anticuerpos monoclonales.

De acuerdo con la invención, se usó una pareja de cebadores específicos para gen (sec. con núm. de ident.: 3, 4) para ISC-468 en análisis por RT-PCR para amplificar el ADNc derivado de un panel amplio de tejidos normales y tumorales. Tal como se esperaba, se confirmó que la placenta es el único tejido sano que expresa este gen (figura 1). No se detectó expresión significativa, en absoluto, en ningún otro tejido normal de un órgano. Más sorprendentemente, cuando se investigaron especímenes de cáncer, encontramos niveles de expresión elevados y significativos en una cantidad de diferentes tipos de tumores, que incluyen carcinomas de colon, páncreas, esófago, estómago, pulmón, mama, ovario, cabeza y cuello, riñón, próstata e hígado (figuras 1 y 2 así como en la tabla 1). El análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real de la expresión de ISC-468 en 60 muestras de carcinoma de mama reveló que el 80 % de las muestras expresó niveles significativos de ISC-468 (figura 3A, B).

Tab.1: Expresión de ISC-468 en tejidos normales y tumorales

Tejidos normales	Expresión
Cerebro	-
Miocardio	-
Músculo esquelético	-
Miocardio	-
Estómago	-
Colon	-
Páncreas	-
Riñón	-
Hígado	-
Testículos	-
Timo	-
Mama	-
Ovario	-
Útero	-

5	Piel	-
	Pulmón	-
	Placenta	+++
	Ganglios linfáticos	-
10	Bazo	-
	PBMC	-
	Próstata	-
15	Tipo de tumor	Expresión
	Carcinoma de colon	+
	Carcinoma pancreático	+
20	Carcinoma esofágico	+
	Carcinoma de estómago	+
	Cáncer de pulmón	+
25	Cáncer de mama	+++
	Carcinoma de ovario	+
	Cáncer de cabeza y cuello	+
30	Cáncer de riñón	+
	Carcinoma de próstata	+
	Carcinoma de hígado	++

35 La expresión selectiva y elevada de los transcritos de ISC-468 en los tumores no se conocía anteriormente y puede usarse, de acuerdo con la invención, para métodos de diagnóstico molecular tales como RT-PCR para detectar células tumorales diseminadas en el suero y en la médula ósea y para detectar metástasis en otros tejidos. Esta molécula puede usarse, además, como objetivo específico para estrategias terapéuticas.

40 De acuerdo con la invención, se seleccionaron, entre otros, los péptidos siguientes para la producción de anticuerpos específicos para ISC-468: sec. con núm. de ident.: 58, 59, 60, 68, 69, 2. La especificidad de los anticuerpos se confirmó mediante análisis por inmunofluorescencia de las células transfectadas ISC-468-eGFP (figura 4A).

45 Se analizó la localización subcelular de ISC-468 en las líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y BT-549 que se expresan de forma endógena mediante análisis por inmunofluorescencia. La tinción tanto de las células fijadas con MeOH (figura 4B) como de las no fijadas (figura 4C) reveló que el ISC-468 se localiza en las membranas plasmáticas de las células que lo expresan. La especificidad de la tinción se confirmó mediante el silenciamiento de la expresión del ISC-468 inducido por ARNi, lo que resulta en la pérdida de tinción de la membrana plasmática.

50 Además, se usaron los anticuerpos específicos para ISC-468 para el análisis inmunohistoquímico de la expresión del ISC-468 en muestras clínicas de mama normal y carcinomas de mama. La expresión del ISC-468 no fue detectable en los especímenes de mama normal (figura 5A, B). Por el contrario, los especímenes de carcinoma de mama mostraron una expresión fuerte y homogénea del ISC-468 (figura 5C,D). Las señales se acentuaron en la membrana plasmática de las células cancerosas que expresaban, lo que confirma que ISC-468 es una proteína de la membrana que se expresa selectivamente en las células cancerosas.

60 De acuerdo con la invención, los dominios extracelulares del ISC-468 pueden usarse como estructura objetivo para el inmunodiagnóstico y la terapia mediante anticuerpos monoclonales. Además, el ISC-468 puede usarse de acuerdo con la invención como vacuna (ARN, ADN, proteína, péptido) para inducir respuestas inmunitarias específicas para el tumor (respuestas inmunitarias mediadas por las células T y B).

65 El silenciamiento de la expresión del ISC-468 inducido por ARNi se alcanzó mediante la transfección de células con dúplex de ARNi que hacen diana específicamente en el ARNm del ISC-468 (sec. con núm. de ident.: 70-73). La transfección de las líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y BT-549 que se expresan de forma endógena resultan en una reducción estable y específica de la expresión del ARNm del ISC-468 (figura 6).

Para obtener más conocimiento sobre el papel fisiológico de la expresión del ISC-468 se realizaron varios ensayos celulares in vitro basados en el ARNi. La transfección de las líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y BT549 con dúplex de ARNi resultó en una reducción evidente de la proliferación celular en comparación con los controles respectivos, como se analizó en un ensayo de proliferación basado en BrdU (figura 7). El análisis del ciclo celular basado en FACS mostró que la abrogación de la proliferación celular resultó en una detención del G1/S (figura 8A, B). Adicionalmente, se podría mostrar que el silenciamiento del ISC-468 inducido por ARNi afecta notablemente la vía de señalización AKT en las células cancerosas que expresan endógenamente mediante la inhibición de la fosforilación de AKT (figura 9). Además, la proliferación de las células MCF-7 se atenuó cuando las células se incubaron con anticuerpos específicos para el ISC-468 generados contra péptidos específicos de ISC- 468 (sec. con núm. de ident.: 68, 69) en comparación con un anticuerpo de control irrelevante (figura 10). Estos resultados indican que el ISC-468 es un factor fundamental para la proliferación de las células cancerosas presumiblemente mediante la mediación en la activación inducida por el factor de crecimiento de la vía de señalización AKT y otros. El ISC-468 mismo puede representar un receptor, correceptor o chaperona unido a la membrana para los factores de crecimiento, quimiocinas u otras sustancias.

Además, se analizó el impacto de la expresión del ISC-468 en la capacidad de migración de las células cancerosas. El silenciamiento de la expresión de ISC-468 inducida por ARNi en las líneas celulares de carcinoma de mama MCF7 y BT-549 resultó en una deficiencia evidente de la quimiotaxis, quimioquinesis y la invasión de las células, como se evaluó en los ensayos de migración transpocillo (figura 11A,B,C). La quimiotaxis, la quimioquinesis y la invasión son factores fundamentales para la metástasis de las células cancerosas a otros órganos. Por consiguiente, la expresión del ISC-468 en las células cancerosas puede ser un factor positivo para la metástasis de las células cancerosas.

En los carcinomas de mama, podría mostrarse que la expresión del ISC-468 se correlaciona con el estado del receptor de estrógeno del tumor. El análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real de la expresión de ISC-468 en 60 muestras de carcinoma de mama reveló que los carcinomas de mama positivos para el receptor del estrógeno mostraron niveles significativamente más elevados de expresión del ISC-468 que los tumores negativos para el receptor (figura 12). Por consiguiente, la expresión del ISC-468 podría inducirse en líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 positivas para el receptor del estrógeno mediante el tratamiento con 17β -estradiol (figura 13).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG y otros

5 <120> Identificación de antígenos asociados a tumor para el diagnóstico y la terapia

<130> 342-28 EPT10

10 <140> EP15153951.7
<141> 2006-09-06

<150> EP05019786.2
<151> 2005-09-12

15 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
<211> 1126
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 1

```

atatatcaga ccatcagaag gatttgtata aagagtgact ctctatgaa ggtaaaggcc      60
accctcttc agttccagtg actgagatac atttttccaa tcctgggggc aaatacagac      120
acagcaagtt ccttcttccc ttggaaatt tggcagctgc cttcaccagt gagcacaag      180
ccacatttca aaggaaactg acaaattatc ccagctgcc agaagaagaa atcctcactg      240
gacggcttcc tgtttcctgt ggttcattat ctgattggct gcagggatga aagtttttaa      300
gttcatagga ctgatgatcc tcctcacctc tgcgttttca gccggttcag gacaaagtcc      360
aatgactgtg ctgtgtcca tagactggtt catggtcaca gtgcaccctc tcatgctaaa      420
caacgatgtg tgtgtacact ttcatgaact aacttgggc ctgggttgcc ccccaaacca      480
tgttcagcca cagcctacc agttcaccta ccgtgttact gaatgtggca tcagggccaa      540
agctgtctct caggacatgg ttatctacag cactgagata cactactctt ctaagggcac      600
gccatctaag tttgtgatcc cagtgtcatg tgctgcccc caaaagtccc catggctcac      660
caagccctgc tccatgagag tagccagcaa gagcagggcc acagcccaga aggatgagaa      720
atgctacgag gtgttcagct tgtcacagtc cagtcaaagg cccaactgcg attgtccacc      780
ttgtgtcttc agtgaagaag agcataccca ggtcccttgt caccaagcag gggctcagga      840
ggctcaacct ctgcagccat ctcactttct tgatatttct gaggattggt ctcttcacac      900
agatgatatg attgggtcca tgtgatcctc aggtttgggg tctcctgaag atgctatttc      960
tagaattagt atatagtgta caaatgtctg acaaataagt gctcttgtga ccctcatgtg     1020
agcacttttg agaaagagaa acctatagca acttcatgaa ttaagccttt ttctatattt     1080
ttatattcat gtgtaaacia aaaataaaat aaaattctga tcgcat                       1126

```

30 <210> 2

ES 2 664 386 T3

<211> 212
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Met Lys Val Phe Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala
 1 5 10 15

Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile
 20 25 30

Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val
 35 40 45

Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn
 50 55 60

His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys
 65 70 75 80

Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr
 85 90 95

Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro
 100 105 110

Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys
 115 120 125

Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu
 130 135 140

Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn
 145 150 155 160

Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val
 165 170 175

Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser
 180 185 190

His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met
 195 200 205

10

Ile Gly Ser Met
 210

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

ES 2 664 386 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 3
 5 aaatttgca gctgccttca c 21

<210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 4
 15 tgatgccaca ttcagtaaca c 21

<210> 33
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 33
 25 cgtgagcgc tgcagatgtcc g 21

<210> 34
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 34
 35 cctaaccagc tgccaactg tag 23

<210> 58
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 45 Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys
 1 5 10

<210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 55 Cys Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp
 1 5 10

<210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Cys Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys
 1 5 10

5 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

10 Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro
 1 5 10

<210> 69
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69

20 Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp
 1 5 10

<210> 70
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> hebra sentido de ARNip

30 <220>
 <221> caract_miscláneas

<222> (1)..(19)
 <223> bases de ribonucleótido

35 <400> 70
 ccaugagagu agccagcaat t 21

<210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> hebra antisentido de ARNip

<220>
 <221> caract_miscláneas

50 <222> (1)..(19)
 <223> bases de ribonucleótido

<400> 71
 uugcuggcua cucucaugga g 21

55 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> hebra sentido de ARNip

5 <220>
<221> caract_miscláneas
<222> (1)..(19)
<223> bases de ribonucleótido
<400> 72
gguucaggac aaaguccaat t 21

10 <210> 73
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> hebra antisentido de ARNip

20 <220>
<221> caract_miscláneas
<222> (1)..(19)
<223> bases de ribonucleótido
<400> 73
uuggacuuug uccugaaccg g 21

25

Reivindicaciones

- 5
1. Una composición farmacéutica para su uso en un método de terapia, que comprende un anticuerpo que se une a la porción extracelular de un antígeno asociado a tumor, dicho antígeno asociado a tumor tiene una secuencia codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en:
(a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la sec. con núm. de ident.: 1, y
(b) un ácido nucleico que es al menos un 95 % idéntico al ácido nucleico de (a).
- 10
2. La composición farmacéutica para su uso como se reivindicó en la reivindicación 1, en donde el método de terapia es un método de tratamiento o prevención de un cáncer caracterizado por la expresión del antígeno asociado a tumor de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el cáncer es preferentemente un tumor esofágico, un tumor ovárico, un tumor de cabeza y cuello, un tumor de riñón, un tumor de hígado, un tumor de pulmón, un tumor de mama, un tumor de próstata, un tumor de colon, un tumor gástrico, un cáncer de estómago, un tumor pancreático, un carcinoma de célula renal, un carcinoma de colon o un carcinoma de mamario.
- 15
3. La composición farmacéutica para su uso como se reivindicó en las reivindicaciones 1 o 2, en la que el antígeno asociado a tumor comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 2, 58, 59, 60, 68 y 69.
- 20
4. La composición farmacéutica para su uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo.
- 25
5. La composición farmacéutica para su uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el anticuerpo se acopla a un agente terapéutico o de diagnóstico.
- 30
6. La composición farmacéutica para su uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que está en forma de una vacuna.

35

40

45

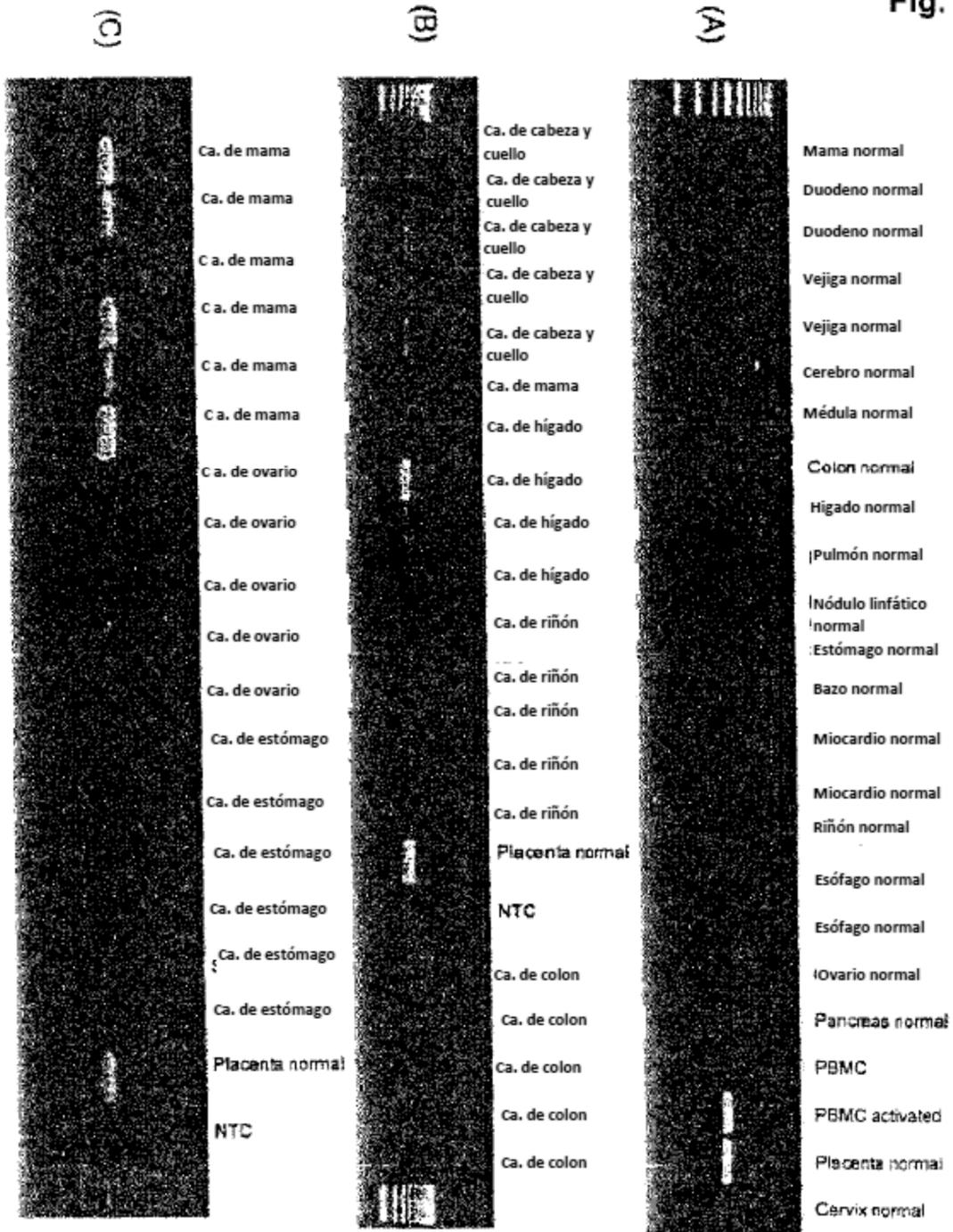
50

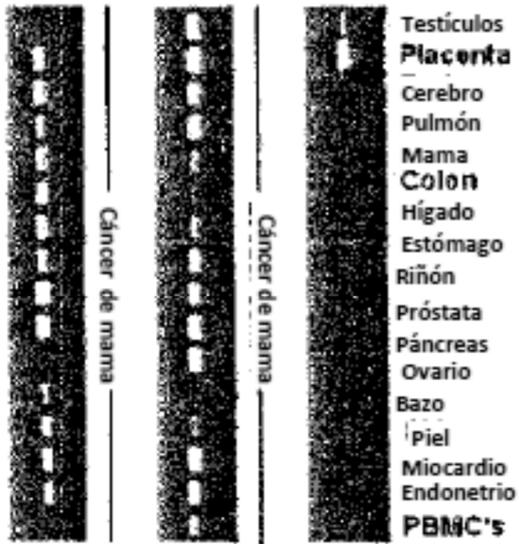
55

60

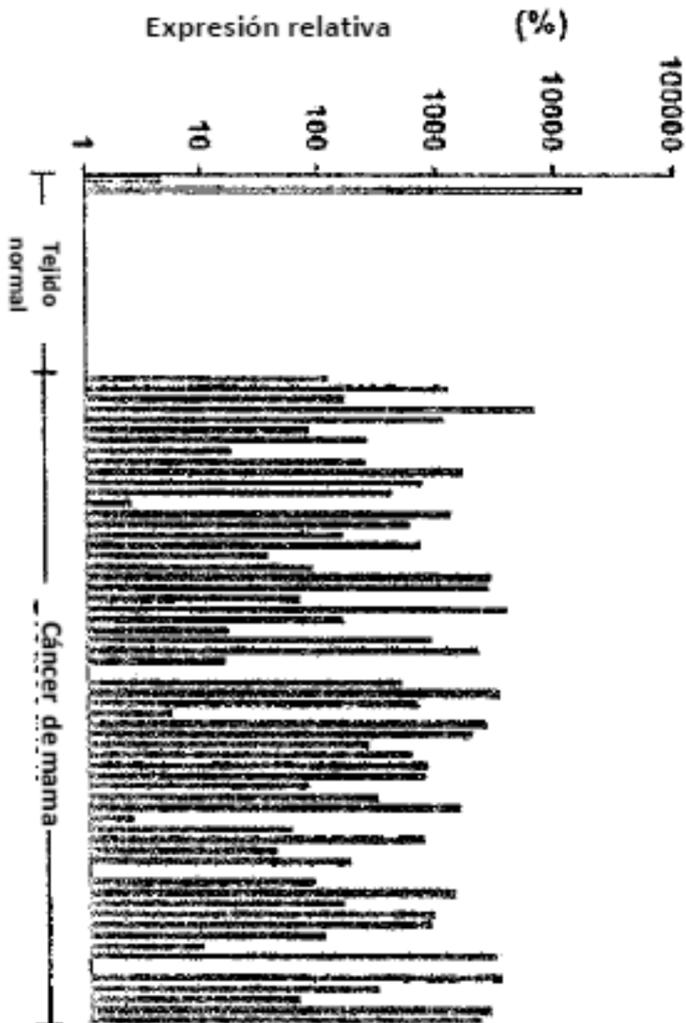
65

Fig. 1





(A) Fig. 3



(B)

Fig. 4

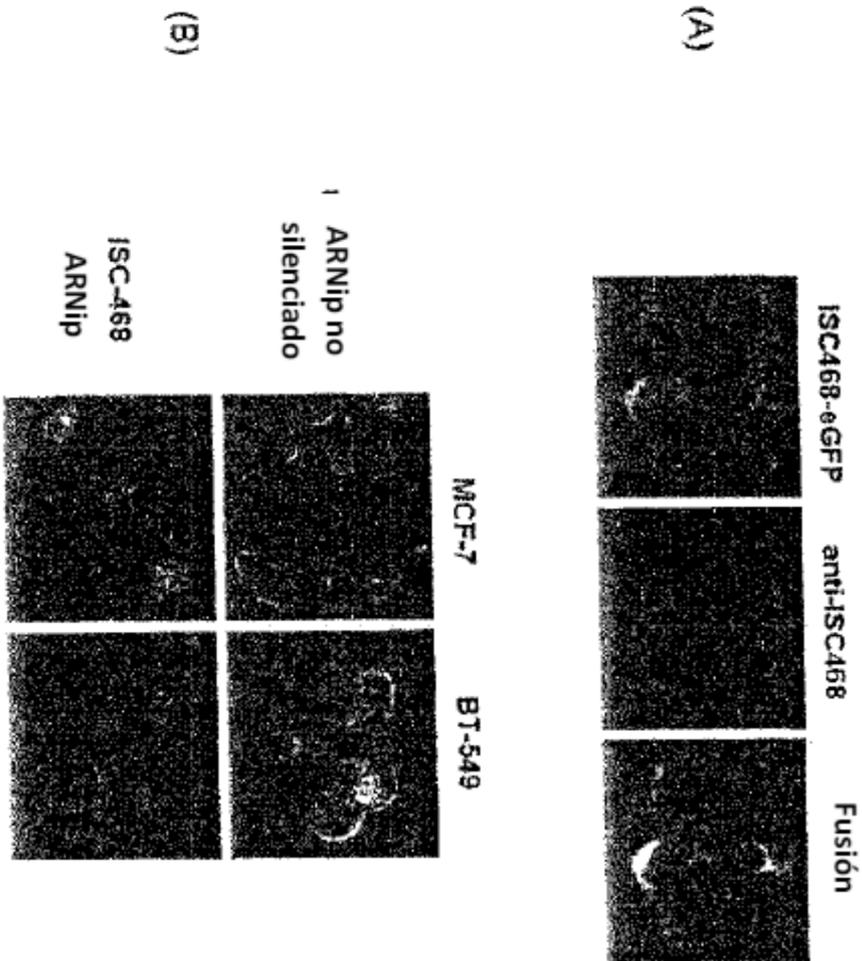
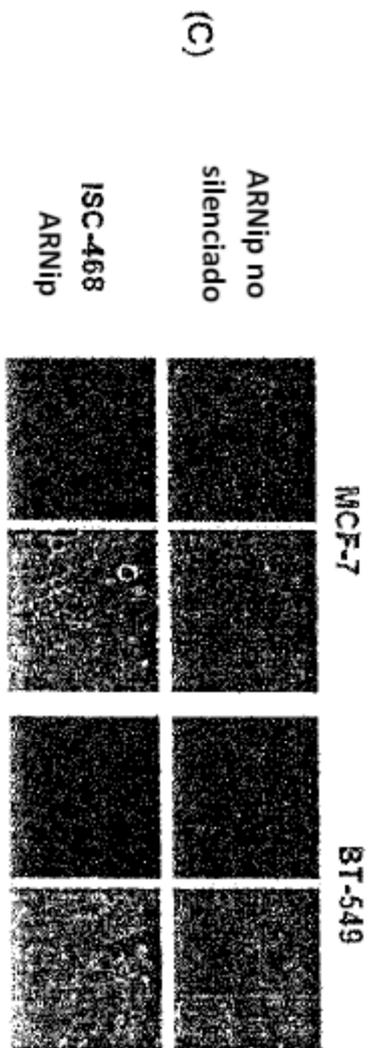


Fig. 4



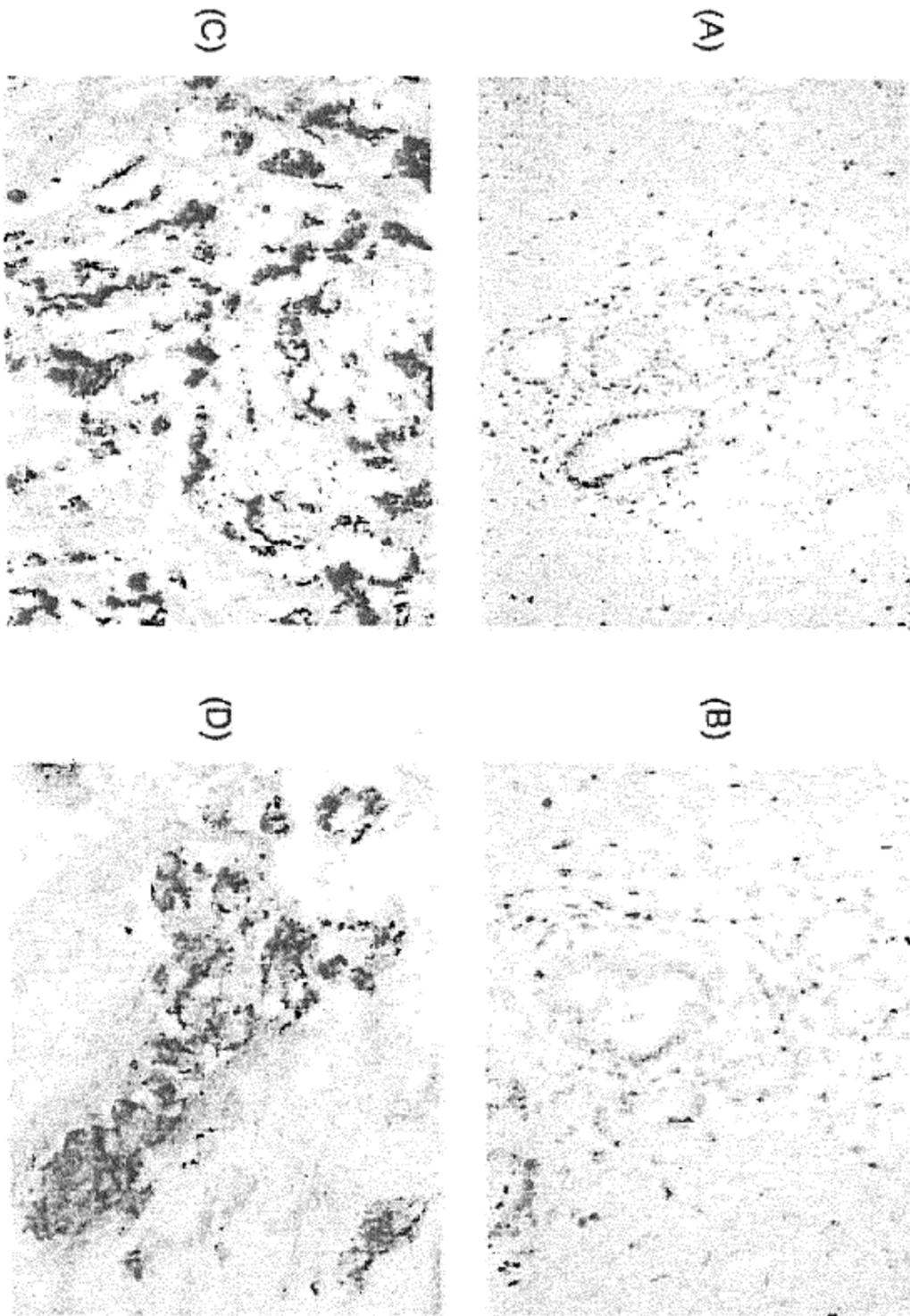


Fig. 5

Fig. 6

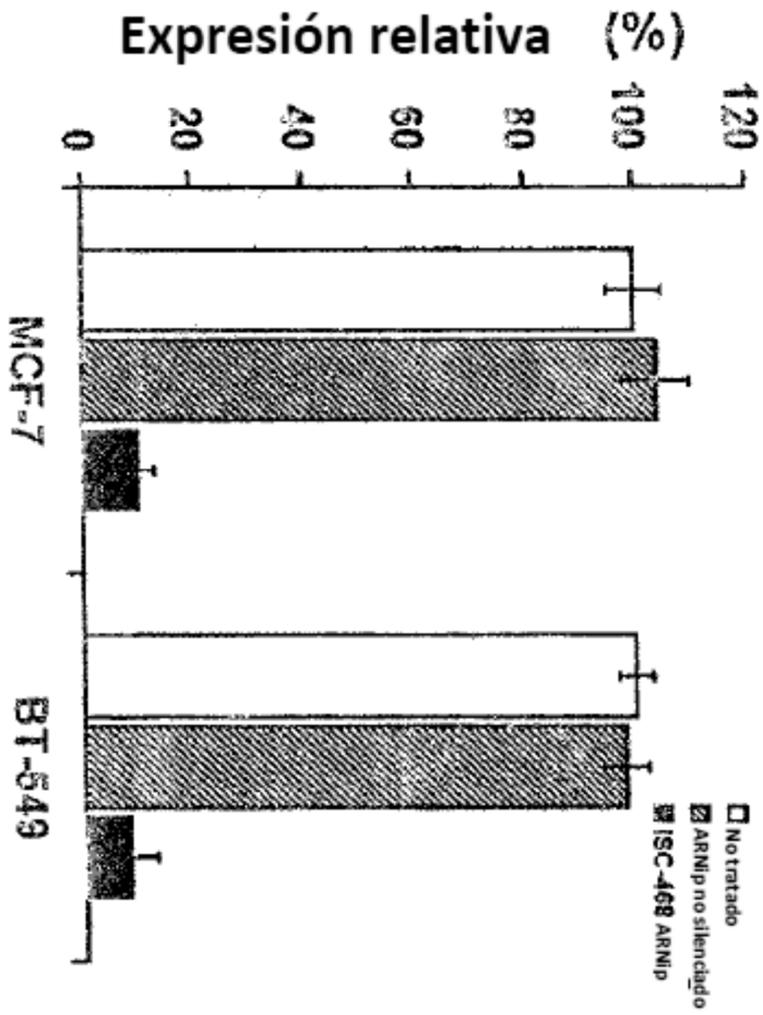


Fig. 7

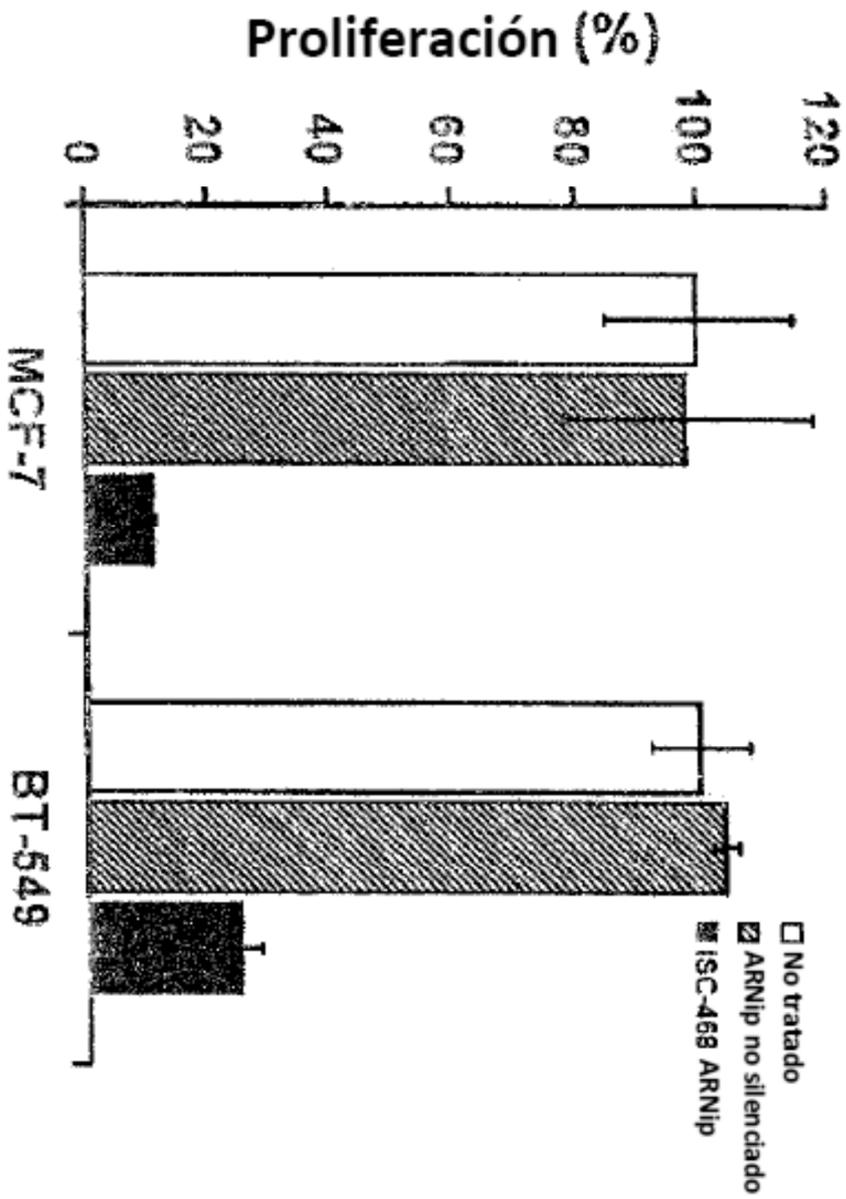


Fig. 8

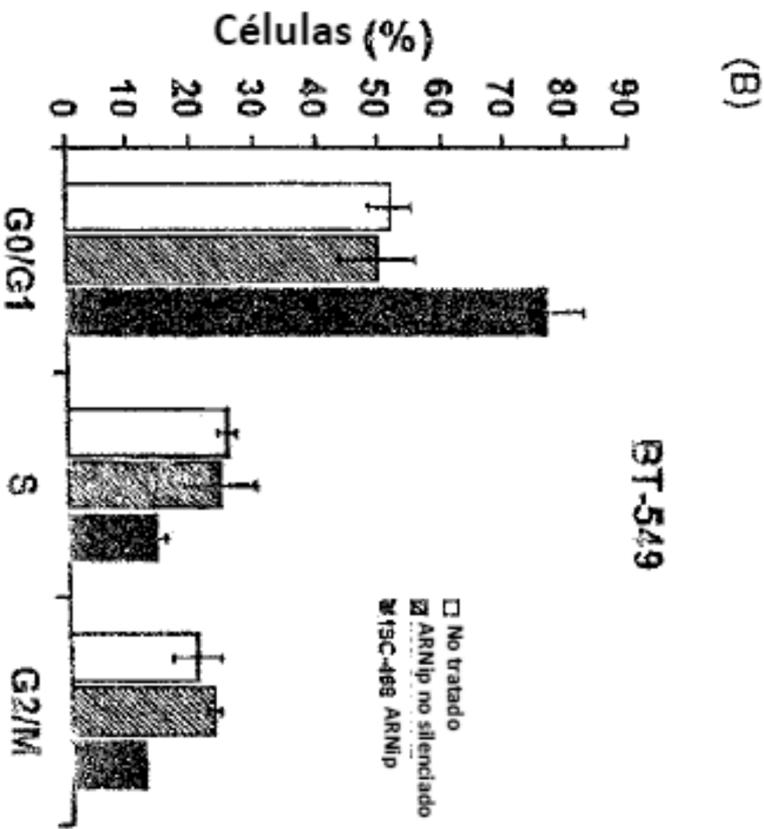
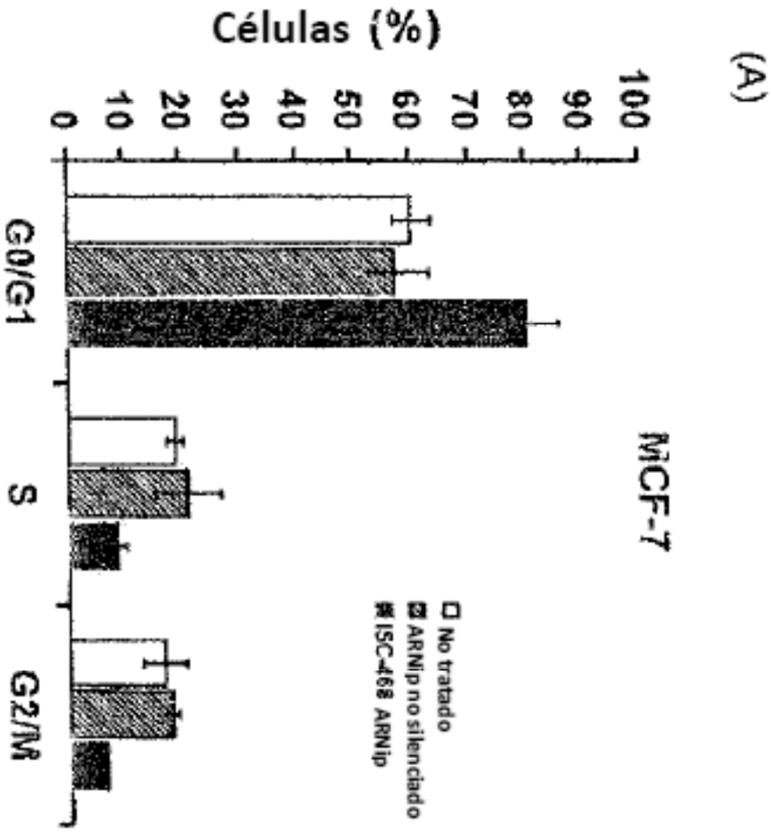


Fig. 9

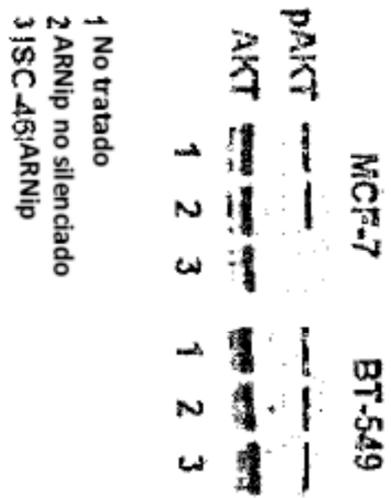


Fig. 10

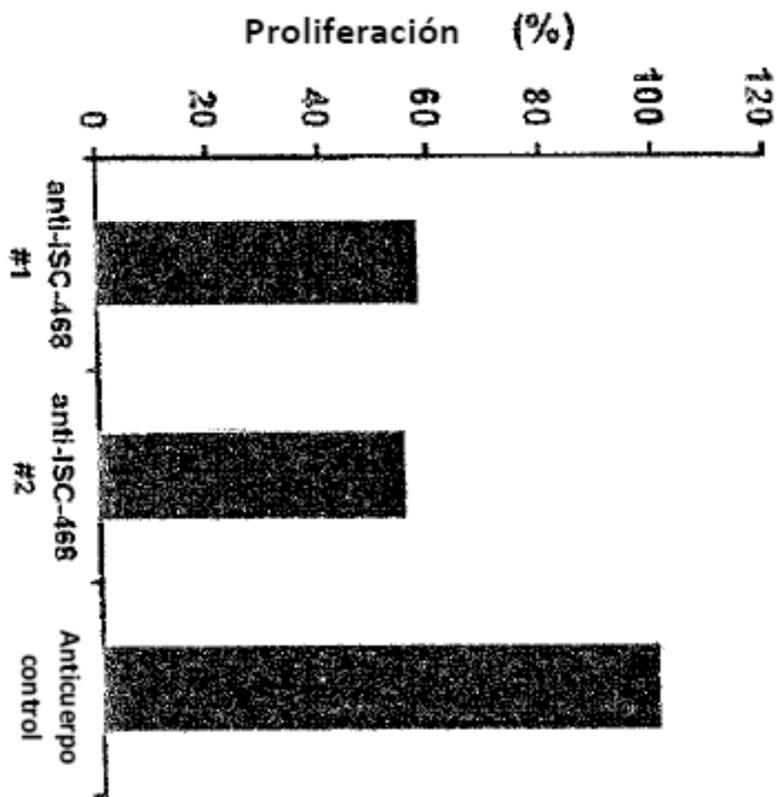


Fig. 11

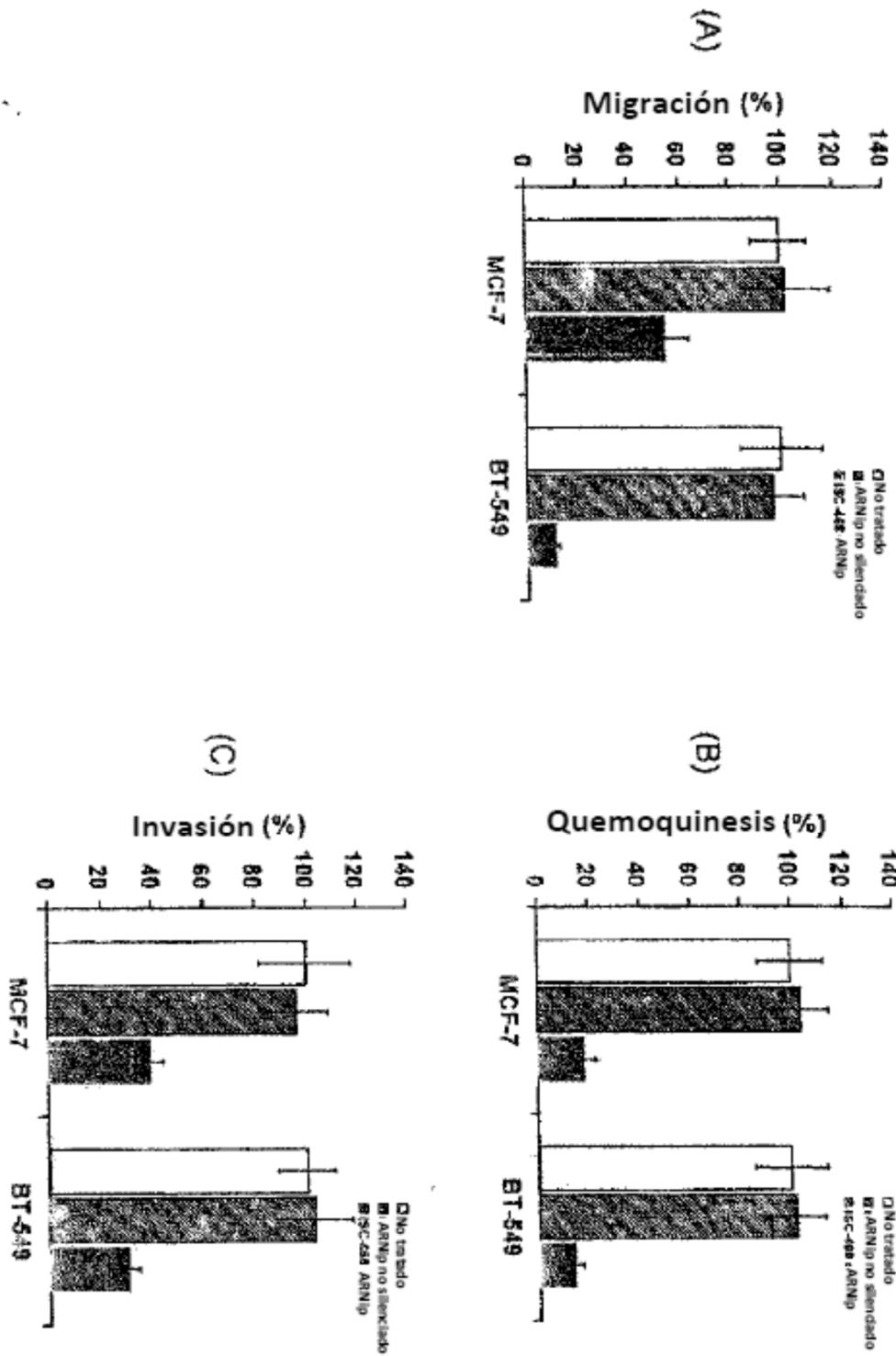


Fig. 12

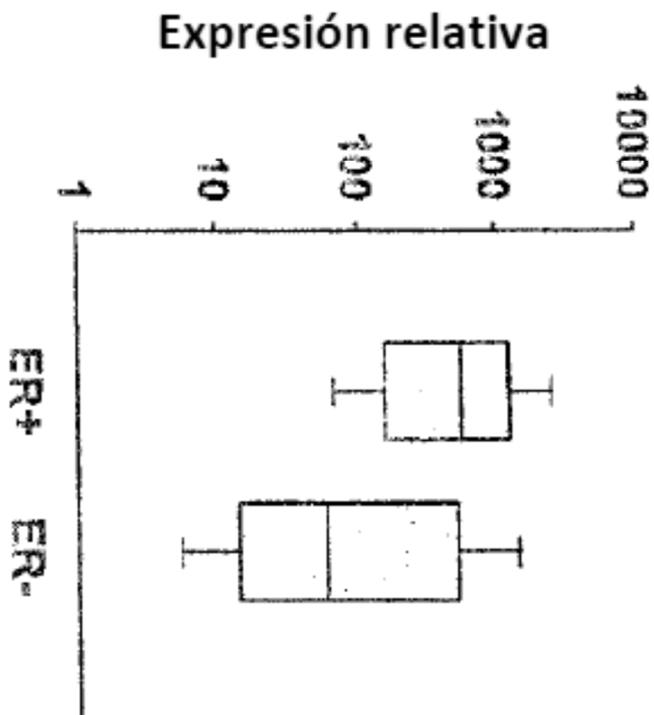


Fig. 13

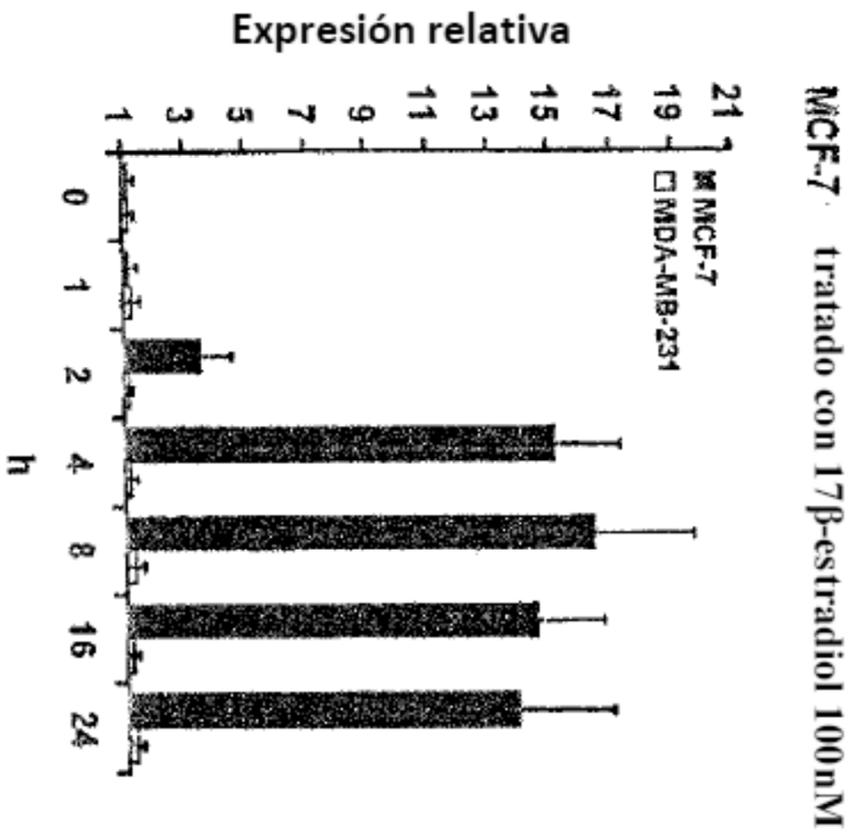


Fig. 14

SeqID	Secuencia
1	ATATATCAGACCATCGAAGGATTTGTATAAAGAGTGACTCTCCTATGAAGGTAAAGGCCACCCCTCTTC AGTTCCAGTGACTGAGATACATTTTTCCAATCCTGGGGCAAATACASACACAGCAAGTTCCCTTCTCCC TTTGGAAATTTGGCAGCTGCCTTCACCAAGTGAGCACAAAGCCACATTTCAAGGAAACTGACAAATTATC CCCAGCTGCCAGAAGAAGAAATCCTCACTGGACGGCTTCCTGTTCCTGTGGTTCAATTATCTGATTGGCT GCAGGGATGAAAGTTTTAAGTTCATAGGACTGATGATCCTCCTCACCTCTGGCTTTTCAGCCGTTTCAG GACAAAGTCCAATGACTGTGCTGTGCTCCATAGACTGGTTTCATGGTCACAGTGCACCCCTTCATGCTAAA CAACGATGTGTGTGTACACTTTCATGAACTACACTTGGGGCTGGGTTGCCCCCAAAACCATGTTTCAGCCA CACGCTACCAGTTCACCTACCGTGTACTGAATGTGGCATCAGGGCCAAAGCTGTCTCTCAGGACATGG TTATCTACAGCACTGAGATACACTACTCTTCTAAGGGCAGGCCATCTAAGTTTGTGATCCCAGTGTCTAG TGCTGCCCCCAAAGTCCCATGGCTCAOCCAAGCCCTGCTCCATGAGAGTAGCCAGCAGAGAGCAGGGCC ACAGCCCAGAAGGATGAGAAA*GCTACGAGGTGTTTCAGCTTGTACAGTCCAGTCAAAGGCCCAACTGGG ATTGTCCACCTTGTGTCTTCAGTGAAGAAGAGCATACCCAGGTCCCTTGTCCACCAAGCAGGGGCTCAGGA GGCTCAAACCTCTGCAGCCATCTCACTTTCTTGTATTTCTGAGGATTGGTCTCTTCACACAGATGATATG ATTGGGTCCATGTGATCCTCAGGTTTGGGGTCTCCTGAAGATGCTATTTCTAGAATTAGTATATAGTGT CAAATGTCTGACAAATAAGTCTCTTGTGACCCCTCATGPGAGCACTTTTGAGAAAGAGAAACCTATAGCA ACTTCATGAATTAAGCCTTTTCTATATTTTTATATTCATGTGTAACAAAAAACAAATAAAATTTCTGA TCGCAT
2	MKVEKFIGLMI LLTSAFSAAGSGQSPMTVLC SIDWFMVTVHPFMLNNDVCVH FHELHLGLGCPNHVQPHA YQFTYRVTECGIRAKAVSQDMVLYSTEIHYSSKGTPSKFI PVSCAAPQKSPWLTKPCSMRVASKSRATA QKDEKCYEVFSLSQSSQRPNDCPPCVFSEEHNTQVPCHQAGAQEAQPLQPSHFLDISEDWLSLHTDDMIG SM
3	AAATTTGGCAGCTGCCTTCAC
4	TGATGCCACATTCAGTAACAC
33	cgtgagcgttcgagatgttcg
34	cctaaccagctgcccactgtag
58	APQKSPWLTKPC
59	CFLQPSHFLDISED
60	CIYSTEIHYSSK
68	APQKSPWLTKP
69	PLQPSHFLDISED
70	r(CCAUGAGAGUAGCCAGCAA) dTdT
71	r(UUGCUGGUACUCUCAUGG) dAdG
72	r(GGUUCAGGACAAAGUCCAA) dTdT
73	r(UUGGACUUGUCCUGAACCC) dGdG