

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 053**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2003** **E 10010629 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018** **EP 2289910**

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

30 Prioridad:

**13.03.2002 DE 10211088**

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

**05.10.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 685 053 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Productos génicos de expresión diferencial en tumores y su uso

[0001] Pese a los enfoques interdisciplinarios y al agotamiento de las modalidades de terapia clásicas, las enfermedades de cáncer siguen siendo una de las principales causas de muerte. Los conceptos terapéuticos más recientes tienen como objetivo incluir el sistema inmunitario propio del paciente en el concepto terapéutico general utilizando vacunas tumorales recombinantes y otros procedimientos específicos, como la terapia con anticuerpos. La condición para que una estrategia de este tipo sea satisfactoria es el reconocimiento de los antígenos específicos de un tumor o asociados a un tumor, o epítomos, por el sistema inmunitario del paciente, cuyas funciones efectoras se deben reforzar de forma intervencional. Las células tumorales presentan una diferencia biológica esencial de sus células de origen no malignas. Estas diferencias están causadas por las modificaciones genéticas adquiridas durante el desarrollo del tumor y también dan lugar a, entre otros, la formación de estructuras moleculares modificadas cualitativa o cuantitativamente en las células cancerosas. Si las estructuras de este tipo asociadas a un tumor son reconocidas por el sistema inmunitario específico del huésped portador del tumor, se habla de antígenos asociados a un tumor. En el reconocimiento específico de los antígenos asociados a un tumor participan mecanismos celulares y humorales que representan dos unidades conectadas funcionalmente entre sí: los linfocitos T CD4+ y CD8+ reconocen antígenos procesados que se presentan en las moléculas del MHC (Major Histocompatibility complex = antígenos de histocompatibilidad) de las clases II y I, respectivamente, mientras que los linfocitos B producen moléculas de anticuerpos circulantes que se unen directamente a antígenos sin procesar. La relevancia clínico-terapéutica potencial de los antígenos asociados a un tumor resulta del hecho de que el reconocimiento de los antígenos en las células neoplásicas por parte del sistema inmunitario da lugar a la iniciación de mecanismos efectores citotóxicos y, en presencia de células T colaboradoras, puede provocar la eliminación de las células cancerosas (Pardoll, Nat. Med. 4:525-31, 1998). Por consiguiente, un objetivo principal de la inmunología tumoral es el de definir molecularmente estas estructuras. La naturaleza molecular de estos antígenos fue un enigma durante mucho tiempo. Hasta que se desarrollaron las técnicas de clonación correspondientes, no se consiguió rastrear sistemáticamente los bancos de expresión de ADNc en tumores en antígenos asociados a un tumor mediante el análisis de las estructuras diana de los linfocitos T citotóxicos (CTL) (van der Bruggen et al., Science 254:1643-7, 1991) o con autoanticuerpos circulantes (Sahin et al., Curr. Opin. Immunol. 9:709-16, 1997) como sondas. Para ello, se prepararon bancos de expresión de ADNc a partir de tejido tumoral fresco y se expresaron como proteínas de forma recombinante en sistemas adecuados. Para clonar los respectivos antígenos, se usaron efectores inmunitarios aislados de pacientes, en concreto, clones de CTL con un patrón de lisis específico del tumor o autoanticuerpos circulantes.

[0002] Mediante estos enfoques se ha definido una pluralidad de antígenos en distintas neoplasias en los últimos años. En este aspecto, resulta de gran interés la clase de los antígenos testiculares de cáncer (ATC). Los ATC y los genes que los codifican (genes testiculares de cáncer o GTC) se definen por su patrón de expresión característico [Tureci et al, Mol Med Today. 3:342-9, 1997]. No se encuentran en los tejidos normales, a excepción de los testículos o las células germinales, pero se expresan en una serie de tumores malignos humanos, y no específicos de tumores, sino con distinta frecuencia en entidades tumorales de origen muy diverso (Chen & Old, Cancer J. Sci. Am. 5:16-7, 1999). Tampoco se encuentran reactividades serosas contra ATC en controles sanos, sino solo en pacientes con tumor. Particularmente debido a su distribución tisular, esta clase de antígenos tiene un valor especial para fines inmunoterapéuticos y se está poniendo a prueba en estudios clínicos de pacientes que se están desarrollando en la actualidad (Marchand et al., Int. J. Cancer 80:219-30, 1999; Knuth et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 46: S46-51, 2000).

[0003] No obstante, los métodos clásicos para identificar antígenos mostrados más arriba utilizan como sondas efectores inmunitarios (autoanticuerpos circulantes o clones de CTL) de pacientes con un cáncer por lo general ya avanzado. De una serie de datos se deduce que los tumores pueden dar lugar a, p. ej., la inducción de tolerancia y la anergización de las células T, y que, precisamente en el transcurso de la enfermedad, se pierden los aspectos específicos del repertorio de efectores inmunitarios que podrían provocar un reconocimiento inmunológico efectivo. De los estudios actuales en pacientes no se ha encontrado ninguna prueba definitiva de un efecto real de los antígenos asociados a un tumor descubiertos y usados hasta la fecha. Por consiguiente, no se puede descartar que las proteínas evocadas por las respuestas inmunitarias espontáneas sean las estructuras diana equivocadas.

[0004] La tarea de la presente invención era proporcionar estructuras diana para un diagnóstico y una terapia de las enfermedades de cáncer.

[0005] Esta tarea se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones según la invención.

[0006] Según la invención, se persiguió una estrategia para identificar y proporcionar antígenos expresados asociados a tumores y los ácidos nucleicos que los codifican. Esta estrategia se basa en el hecho de que, en realidad, genes específicos de los testículos y, con ello, de las células germinales, se reactivan en células tumorales de forma ectópica e indebida. En primer lugar, se elabora una lista lo más completa posible de todos los genes específicos de órganos conocidos mediante prospección de datos y, después, esta se evalúa respecto a su activación aberrante en tumores mediante análisis de expresión a través de una RT-PCR específica. La prospección de datos es un método conocido para identificar genes asociados a un tumor. Sin embargo, en las estrategias convencionales, los transcriptomas de bancos de tejidos normales se suelen restar electrónicamente de los bancos de tejidos tumorales suponiendo que los genes restantes son específicos de tumores (Schmitt et al., Nucleic Acids Res. 27:4251-60, 1999; Vasmatzis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:300-4, 1998; Scheurle et al., Cancer Res. 60:4037-43, 2000).

[0007] No obstante, el concepto según la invención, que ha mostrado ser mucho más satisfactorio, se basa en hacer uso de la prospección de datos para extraer electrónicamente todos los genes específicos de testículo y, después, evaluarlos respecto a su expresión ectópica en tumores.

[0008] Así, en un aspecto se divulga una estrategia para identificar genes con expresión diferencial en tumores. Esta estrategia combina la prospección de datos de bancos de secuencias públicas («*in silico*») con posteriores análisis experimentales de evaluación en laboratorio («*wet bench*»).

[0009] Una estrategia combinada que se basa en dos scripts bioinformáticos distintos permitió identificar nuevos miembros de la clase de gen testicular de cáncer (CT) según la invención. Hasta el momento, estos se habían clasificado simplemente como específicos de testículo, células germinales o esperma. La conclusión de que estos genes se activan de forma aberrante en las células tumorales permite asignarles una calidad esencialmente nueva con implicaciones funcionales. La identificación y provisión de estos genes asociados a un tumor y de los productos génicos codificados por los mismos se efectuaron según la invención sin depender de un efecto inmunógeno.

[0010] Los antígenos asociados a un tumor identificados y divulgados en el presente caso presentan una secuencia de aminoácidos que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO : 19-21, 54-57 y una parte o un derivado de los mismos, (b) un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es redundante con respecto al ácido nucleico de (a) o de (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c). En una forma de realización preferida, un antígeno asociado a un tumor identificado presenta una secuencia de aminoácidos que es codificada por un ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 19-21 y 54-57. En otra forma de realización preferida, un antígeno asociado a un tumor identificado comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 22-24, 58-61, 81, 82 y una parte o un derivado de los mismos.

[0011] La presente divulgación se refiere en general al uso de los antígenos asociados a un tumor divulgados, o de partes de los mismos, de ácidos nucleicos que los codifiquen o de ácidos nucleicos que estén dirigidos contra los ácidos nucleicos codificantes, o de anticuerpos que estén dirigidos contra los antígenos asociados a un tumor identificados o partes de los mismos para la terapia y el diagnóstico. Este uso puede referirse tanto a uno como a combinaciones de varios de estos antígenos, fragmentos funcionales, ácidos nucleicos, anticuerpos, etc., en una forma de realización, también en combinación con otros genes asociados a tumores para un diagnóstico, una terapia y un seguimiento.

[0012] Las enfermedades preferidas para una terapia y/o un diagnóstico son aquellas en las que se encuentra una expresión selectiva o una expresión anómala de uno o varios de los antígenos asociados a tumores identificados según la invención.

[0013] La divulgación también se refiere a ácidos nucleicos y productos génicos con expresión asociada a las células tumorales y que se obtienen mediante el corte y empalme modificado (variantes de corte y empalme) de genes conocidos o mediante la traducción modificada utilizando marcos abiertos de lectura alternativos. Estos ácidos nucleicos comprenden las secuencias según SEQ ID NO: 20, 21 y 54-57 de la lista de secuencias. Los productos génicos comprenden además secuencias según (SEQ ID NO: 23, 24 y 58-61) de la lista de secuencias. Las variantes de corte y empalme divulgadas se pueden usar como objetivos para el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades tumorales.

[0014] Los más diversos mecanismos pueden ser la causa de la aparición de variantes de corte y empalme, por ejemplo

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

[0015] El corte y empalme modificado de un gen da lugar a una secuencia de transcripción modificada (variante de corte y empalme). Si una variante de corte y empalme se traduce en la zona de su secuencia modificada, se obtiene como resultado una proteína modificada que se puede diferenciar claramente de la originaria en su estructura y función. En el caso de las variantes de corte y empalme asociadas a tumores, pueden surgir transcritos asociados a tumores y proteínas/antígenos asociados a tumores. Estos se pueden usar como marcadores moleculares, tanto para detectar células tumorales como para el tratamiento dirigido de tumores. La detección de las células tumorales, p. ej., en la sangre, el suero, la médula ósea, el esputo, el lavado bronquial, las secreciones corporales y las biopsias de tejidos se puede efectuar, p. ej., mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de variantes de corte y empalme después de la extracción. Para la detección son adecuados todos los sistemas de detección dependientes de secuencias. Además de la PCR, estos son, p. ej., los sistemas de genochip/micromatriz, el método Northern blot, los ensayos de protección de RNAsa (RDA) y otros. Todos los sistemas de detección tienen en común que la detección se basa en una hibridación específica con al menos una secuencia de ácido nucleico específica de las variantes de corte y empalme. Sin embargo, la detección de las células tumorales también se puede efectuar según la invención mediante anticuerpos que reconocen un epítipo específico codificado por la variante de corte y empalme. Para la preparación de los anticuerpos se pueden usar péptidos que sean muy específicos de esta variante de corte y empalme para la inmunización. Para la inmunización son especialmente adecuados los aminoácidos que presentan claras diferencias de epítipos con la o las variantes del producto génico que se forma o se forman preferiblemente en las células sanas. Así, la detección de las células tumorales con anticuerpos se puede efectuar en una muestra aislada del paciente o en forma de adquisición de imágenes con anticuerpos aplicados de forma intravenosa. Además de la utilidad diagnóstica, las variantes de corte y empalme que presentan epítipos nuevos o modificados representan objetivos atractivos para la terapia inmunitaria. Los epítipos se pueden usar para la manipulación dirigida de los anticuerpos monoclonales o linfocitos T eficaces desde un punto de vista terapéutico. En este sentido, en la inmunoterapia pasiva se transfieren de forma adoptiva anticuerpos o linfocitos T que reconocen epítipos específicos de variantes de corte y empalme. La generación de anticuerpos, como en otros antígenos, también se puede efectuar utilizando tecnologías estándares (inmunización de animales, estrategias de enriquecimiento para el aislamiento de anticuerpos recombinantes) utilizando polipéptidos que contengan estos epítipos. De forma alternativa, para la inmunización se pueden usar ácidos nucleicos que codifiquen oligo- o polipéptidos que contengan estos epítipos. Se conocen y se han descrito ampliamente distintas técnicas (p. ej., Kessler JH, et al. 2001, Sahin et al., 1997) para la generación in vitro o in vivo de linfocitos T específicos de epítipos, y se basan igualmente en el uso de oligo- o polipéptidos que contienen los epítipos específicos de las variantes de corte y empalme o de ácidos nucleicos que los codifican. Los oligo- o polipéptidos que contienen estos epítipos específicos de las variantes de corte y empalme o los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos también se pueden usar para su aprovechamiento en la inmunoterapia activa (vacunación, vacunoterapia) como sustancias eficaces desde un punto de vista farmacéutico.

[0016] En un aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente que reconoce el antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación y, preferentemente, es selectivo para las células que presentan una expresión o una expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. En determinadas formas de realización, el agente puede provocar la inducción de la muerte celular, la reducción del crecimiento celular, el daño de la membrana celular o la secreción de citocinas, y, preferentemente, presenta una actividad inhibitoria del tumor. En una forma de realización, el agente es un ácido nucleico no codificante que hibrida de forma selectiva con el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el agente es un anticuerpo que se une de forma selectiva al antígeno asociado al tumor, particularmente, un anticuerpo activado por el complemento que se une de forma selectiva al antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el agente comprende varios agentes que reconocen respectivamente distintos antígenos asociados a un tumor de forma selectiva, de forma que, al menos uno de los antígenos asociados a un tumor, es un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. El reconocimiento no tiene que ir directamente acompañado de una inhibición de la actividad o de la expresión del antígeno. En este aspecto de la enseñanza divulgada, el antígeno limitado de forma selectiva a los tumores sirve preferentemente como marcación para reunir mecanismos efectores en este lugar específico. En una forma de realización preferida, el agente es un linfocito T citotóxico que reconoce el antígeno en una molécula HLA y lisa la célula marcada de esta forma. En otra

forma de realización, el agente es un anticuerpo que se une de forma selectiva al antígeno asociado al tumor y, con ello, reúne mecanismos efectores naturales o artificiales en esta célula.

[0017] En otra forma de realización, el agente es un linfocito T colaborador que potencia las funciones efectoras de otras células que reconocen este antígeno de forma específica.

5 [0018] En un aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la expresión o la actividad de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. En una forma de realización preferida, el agente es un ácido nucleico no codificante que hibrida de forma selectiva con el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el agente es un anticuerpo que se une de forma selectiva al antígeno asociado al tumor. En otra forma de realización, el agente comprende varios  
10 agentes que inhiben respectivamente la expresión o la actividad de distintos antígenos asociados a un tumor de forma selectiva, de forma que, al menos uno de los antígenos asociados al tumor es un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación.

[0019] Por otra parte, la enseñanza divulgada se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente que, en una administración, aumenta de forma selectiva la cantidad de complejos entre una molécula HLA y un epítipo de un péptido del antígeno asociado a un tumor identificado según la invención. En una forma de realización, el agente comprende uno o varios componentes que se seleccionan del grupo formado por (i) el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, (ii) un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, (iii) una célula huésped que expresa el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, y (iv) complejos aislados entre epítopos de péptidos del antígeno asociado al tumor y una molécula MHC. En una forma de realización,  
15 el agente comprende varios agentes que aumentan respectivamente la cantidad de complejos entre las moléculas del MHC y los epítopos de los péptidos de distintos antígenos asociados a tumores de forma selectiva, de manera que al menos uno de los antígenos asociados a un tumor es un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención.

[0020] Por otra parte, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o varios componentes que se seleccionan del grupo formado por (i) un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención o una parte del mismo, (ii) un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención o una parte del mismo, (iii) un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención o a una parte del mismo, (iv) un ácido nucleico no codificante que hibrida de forma específica con un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención y (v)  
25 una célula huésped que expresa un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención o una parte del mismo.

[0021] Un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención o una parte del mismo puede encontrarse en la composición farmacéutica en un vector de expresión y estar enlazado funcionalmente con un promotor.

[0022] Una célula huésped contenida en una composición farmacéutica según la invención puede secretar el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo, expresarlo en la superficie o expresar adicionalmente una molécula HLA que se una al antígeno asociado al tumor o a la parte del mismo. En una forma de realización, la célula huésped expresa la molécula HLA de forma endógena. En otra forma de realización, la célula huésped expresa la molécula HLA y/o el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo de forma recombinante. Preferentemente, la célula huésped no es proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula que presenta un antígeno, particularmente, una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.  
35

[0023] Un anticuerpo contenido en una composición farmacéutica según la invención puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, un fragmento de un anticuerpo natural o un anticuerpo sintético, los cuales se pueden preparar mediante técnicas combinatorias. El anticuerpo puede estar ligado a un agente útil desde un punto de vista terapéutico o diagnóstico.  
40

[0024] Un ácido nucleico no codificante contenido en una composición farmacéutica puede comprender una secuencia de 6-50, particularmente, de 10-30, 15-30 y 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor identificado según la invención.

[0025] En otras formas de realización, un antígeno asociado a un tumor proporcionado, bien directamente, o bien mediante la expresión de un ácido nucleico por la composición farmacéutica o una parte del mismo, se une a  
50

moléculas del MHC en la superficie de las células, de forma que la unión provoca preferentemente una reacción citolítica y/o induce una liberación de citocina.

5 [0026] Una composición farmacéutica puede comprender un vehículo y/o un adyuvante farmacéuticamente compatible. El adyuvante se puede seleccionar de entre saponina, GM-CSF, nucleótidos CpG, ARN, una citocina o una quimiocina. Preferentemente, se emplea una composición farmacéutica según la invención para el tratamiento de una enfermedad que se distingue por la expresión selectiva o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor. En una forma de realización preferida, la enfermedad es el cáncer.

10 [0027] Por otra parte, la enseñanza divulgada se refiere a métodos para el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de uno o varios antígenos asociados a un tumor. En una forma de realización, el tratamiento comprende la administración de una composición farmacéutica según la invención.

15 [0028] En un aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. El método comprende la detección de (i) un ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y/o (ii) la detección del antígeno asociado al tumor o de una parte del mismo, y/o (iii) la detección de un anticuerpo contra el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y/o (iv) la detección de linfocitos T citotóxicos o colaboradores que son específicos del antígeno asociado al tumor o de una parte del mismo en una muestra biológica aislada de un paciente. En determinadas realizaciones, la detección comprende (i) el contacto de la muestra biológica con un agente que se une de forma específica al ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, al antígeno asociado al tumor o a la parte del mismo, al anticuerpo o a linfocitos T citotóxicos o colaboradores que son específicos del antígeno asociado al tumor o de las partes del mismo, y (ii) la detección de la formación de un complejo entre el medio y el ácido nucleico o la parte del mismo, el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo, el anticuerpo o los linfocitos T citotóxicos o colaboradores. En una forma de realización, la enfermedad se distingue por la expresión o la expresión anómala de varios antígenos distintos asociados a un tumor, y la detección comprende la detección de varios ácidos nucleicos que codifican los varios antígenos distintos asociados a un tumor o las partes de los mismos, la detección de los varios antígenos distintos asociados al tumor o de las partes de los mismos, la detección de varios anticuerpos que se unen a los varios antígenos distintos asociados al tumor o a las partes de los mismos, o la detección de varios linfocitos T citotóxicos o colaboradores que son específicos de los varios antígenos distintos asociados al tumor. En otra forma de realización, la muestra biológica aislada del paciente se compara con una muestra biológica normal comparable.

20

25

30

[0029] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para determinar la regresión, el desarrollo o la aparición de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado, que comprende la observación de una muestra de un paciente que presenta la enfermedad o del que se sospecha que puede contraer la enfermedad respecto a uno o varios parámetros que se seleccionan del grupo formado por (i) la cantidad de ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, (ii) la cantidad del antígeno asociado al tumor o de una parte del mismo, (iii) la cantidad de anticuerpos que se unen al antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, y (iv) la cantidad de células T citolíticas o células T colaboradoras que son específicas de un complejo entre el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y una molécula del MHC. Preferentemente, el método comprende la determinación del o de los parámetros en una primera muestra en un primer momento y en otra muestra en un segundo momento, de forma que el desarrollo de la enfermedad se obtiene de la comparación de ambas muestras. En determinadas formas de realización, la enfermedad se distingue por la expresión o la expresión anómala de varios antígenos distintos asociados a un tumor, y la observación comprende una observación (i) de la cantidad de los varios ácidos nucleicos que codifican los varios antígenos distintos asociados al tumor o las partes de los mismos y/o (ii) de la cantidad de los varios antígenos distintos asociados al tumor o de las partes de los mismos y/o (iii) de la cantidad de los varios anticuerpos que se unen a los varios antígenos distintos asociados al tumor o a partes de los mismos, y/o (iv) de la cantidad de las varias células T citolíticas o células T colaboradoras que son específicas de los complejos entre los varios antígenos distintos asociados al tumor o las partes de los mismos y las moléculas del MHC.

35

40

45

50 [0030] Se puede efectuar una detección de un ácido nucleico o de una parte del mismo, o una observación de la cantidad de un ácido nucleico o de una parte del mismo, con una sonda de polinucleótidos que hibrida específicamente con el ácido nucleico o con la parte del mismo, o se puede efectuar amplificando selectivamente el ácido nucleico o la parte del mismo. En una forma de realización, la sonda de polinucleótidos comprende una secuencia de 6-50, particularmente, de 10-30, 15-30 y 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico.

- 5 [0031] En determinadas formas de realización, el antígeno asociado al tumor que detectar o la parte del mismo se encuentra de forma intracelular o en la superficie de la célula. Según la invención se puede efectuar una detección de un antígeno asociado a un tumor o una parte del mismo, o una observación de la cantidad de un antígeno asociado a un tumor o de una parte del mismo, con un anticuerpo que se una de forma específica al antígeno asociado al tumor o a la parte del mismo.
- [0032] En otras formas de realización, el antígeno asociado al tumor que detectar o la parte del mismo se encuentra en un complejo con una molécula del MHC, particularmente, con una molécula HLA.
- [0033] Se puede efectuar una detección de un anticuerpo o la observación de la cantidad de anticuerpos con una proteína o un péptido que se una de forma específica al anticuerpo.
- 10 [0034] Se puede efectuar una detección de células T citolíticas o células T colaboradoras, o la observación de la cantidad de células T citolíticas o células T colaboradoras que son específicas de complejos entre un antígeno o una parte del mismo y las moléculas del MHC con una célula que presente el complejo el antígeno o la parte del mismo y una molécula del MHC.
- 15 [0035] Preferentemente, la sonda de polinucleótidos usada para una detección o para una observación, el anticuerpo, la proteína o el péptido, o la célula están marcados de forma que se pueden detectar. En determinadas formas de realización, el marcador que se puede detectar es un marcador radioactivo o un marcador enzimático. De forma adicional, la detección de los linfocitos T se puede efectuar hallando su proliferación, su producción de citocina, así como su actividad citotóxica, que es provocada por la estimulación específica con el complejo de la MHC y el antígeno asociado al tumor o las partes del mismo. Asimismo, la detección de los linfocitos T puede efectuarse por una
- 20 molécula del MHC recombinante, o bien por un complejo de varias moléculas del MHC cargadas con el fragmento inmunógeno respectivo de uno o de varios de los antígenos asociados al tumor, y por el contacto del receptor específico de la célula T, los cuales pueden identificar linfocitos T específicos.
- [0036] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para el tratamiento, el diagnóstico o la observación de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación, que comprende la administración de un anticuerpo que se une al antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, y está ligado al agente terapéutico o diagnóstico. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo natural.
- 25 [0037] Igualmente, la enseñanza divulgada se refiere a un método para el tratamiento de un paciente con una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación, que comprende (i) la extracción de una muestra de células inmunorreactivas del paciente, (ii) el contacto de la muestra con una célula huésped que expresa el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo en condiciones que favorecen una producción de células T citolíticas contra el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, y (iii) la introducción de las células T citolíticas en el paciente, en una cantidad que es adecuada para lisar células que expresan el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo. Igualmente, la enseñanza divulgada se refiere a la clonación del receptor de célula T de las células T citolíticas contra el antígeno asociado al tumor. Este se puede transferir a otras células T, que consiguen así la especificidad deseada y se pueden introducir en el paciente como se describe en (iii).
- 30 [0038] En una forma de realización, la célula huésped expresa una molécula HLA de forma endógena. En otra forma de realización, la célula huésped expresa una molécula HLA y/o el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo de forma recombinante. Preferentemente, la célula huésped no es proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula que presenta un antígeno, particularmente, una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.
- 35 [0039] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor, que comprende (i) la identificación de un ácido nucleico expresado por células asociadas con la enfermedad, el cual codifica el antígeno asociado al tumor identificado según la divulgación, (ii) la transfección de una célula huésped con el ácido nucleico o una parte del mismo, (iii) el cultivo de la célula huésped transferida para una expresión del ácido nucleico (esto no es obligatorio si se alcanza una tasa de transfección elevada) y (iv) la introducción de las células huésped o de una extracción de las mismas en el paciente, en una cantidad que sea adecuada para aumentar la reacción inmunitaria
- 40 [0039] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor, que comprende (i) la identificación de un ácido nucleico expresado por células asociadas con la enfermedad, el cual codifica el antígeno asociado al tumor identificado según la divulgación, (ii) la transfección de una célula huésped con el ácido nucleico o una parte del mismo, (iii) el cultivo de la célula huésped transferida para una expresión del ácido nucleico (esto no es obligatorio si se alcanza una tasa de transfección elevada) y (iv) la introducción de las células huésped o de una extracción de las mismas en el paciente, en una cantidad que sea adecuada para aumentar la reacción inmunitaria contra las células del paciente que se asocian con la enfermedad. Asimismo, el método puede comprender la identificación de una molécula del MHC que presente el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, de forma
- 45 [0039] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor, que comprende (i) la identificación de un ácido nucleico expresado por células asociadas con la enfermedad, el cual codifica el antígeno asociado al tumor identificado según la divulgación, (ii) la transfección de una célula huésped con el ácido nucleico o una parte del mismo, (iii) el cultivo de la célula huésped transferida para una expresión del ácido nucleico (esto no es obligatorio si se alcanza una tasa de transfección elevada) y (iv) la introducción de las células huésped o de una extracción de las mismas en el paciente, en una cantidad que sea adecuada para aumentar la reacción inmunitaria contra las células del paciente que se asocian con la enfermedad. Asimismo, el método puede comprender la identificación de una molécula del MHC que presente el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, de forma
- 50 [0039] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor, que comprende (i) la identificación de un ácido nucleico expresado por células asociadas con la enfermedad, el cual codifica el antígeno asociado al tumor identificado según la divulgación, (ii) la transfección de una célula huésped con el ácido nucleico o una parte del mismo, (iii) el cultivo de la célula huésped transferida para una expresión del ácido nucleico (esto no es obligatorio si se alcanza una tasa de transfección elevada) y (iv) la introducción de las células huésped o de una extracción de las mismas en el paciente, en una cantidad que sea adecuada para aumentar la reacción inmunitaria contra las células del paciente que se asocian con la enfermedad. Asimismo, el método puede comprender la identificación de una molécula del MHC que presente el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, de forma

que la célula huésped exprese la molécula del MHC identificada y presente el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo. La reacción inmunitaria puede comprender una reacción de células B o una reacción de células T.

Por otra parte, una reacción de las células T puede comprender la producción de células T citolíticas y/o células T colaboradoras específicas de las células huésped que presenten el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo o que sean específicas de las células del paciente que expresan el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo.

5 [0040] La enseñanza divulgada también se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación, que comprende (i) la identificación de las células del paciente que expresan cantidades anómalas del antígeno asociado al tumor, (ii) el aislamiento de una muestra de las células, (iii) el cultivo de las células y (iv) la introducción de las células en el paciente, en una cantidad adecuada para activar una reacción inmunitaria contra las células.

[0041] Preferentemente, las células huésped usadas según la divulgación no son proliferativas o se constituyen de forma no proliferativa. Una enfermedad que se distingue por la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor es en particular el cáncer.

15 [0042] Además, la enseñanza divulgada se refiere a un ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 20-21, 54-57 y una parte o un derivado de los mismos, (b) un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es redundante con respecto al ácido nucleico de (a) o de (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c). Además, la enseñanza divulgada se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 23-24, 58-61 y una parte o un derivado de los mismos.

[0043] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a secuencias promotoras de los ácidos nucleicos divulgados. Estas se pueden enlazar funcionalmente con otro gen, preferentemente, en un vector de expresión y, con ello, garantizar la expresión selectiva de este gen en las células correspondientes.

25 [0044] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante, en particular, a una molécula de ADN o ARN que comprende un ácido nucleico según la divulgación.

[0045] La enseñanza divulgada también se refiere a células huésped que contienen un ácido nucleico según la divulgación o una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un ácido nucleico según la divulgación.

30 [0046] Asimismo, la célula huésped puede comprender un ácido nucleico que codifique una molécula HLA. En una forma de realización, la célula huésped expresa la molécula HLA de forma endógena. En otra forma de realización, la célula huésped expresa la molécula HLA y/o el ácido nucleico según la invención, o una parte del mismo, de forma recombinante. Preferentemente, la célula huésped no es proliferativa. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula que presenta un antígeno, particularmente, una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

35 [0047] En otra forma de realización, la enseñanza divulgada se refiere a oligonucleótidos que hibridan con un ácido nucleico identificado según la divulgación y que se pueden usar como sondas genéticas o como moléculas no codificantes. Las moléculas de ácido nucleico en forma de cebadores de oligonucleótidos o las muestras competentes que hibriden con un ácido nucleico identificado según la divulgación o con partes del mismo se pueden usar para encontrar ácidos nucleicos que sean homólogos al ácido nucleico identificado según la divulgación. Para encontrar ácidos nucleicos homólogos se puede usar la amplificación por PCR, así como la hibridación tipo Northern o Southern. La hibridación se puede efectuar en condiciones poco, o mejor, moderadamente, o aún mejor, muy restrictivas. El término «condiciones restrictivas» se refiere, según la divulgación, a condiciones que permiten una hibridación específica entre los polinucleótidos.

40 [0048] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a una proteína o un polipéptido que son codificados por un ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 20-21 y 54-57, y una parte o un derivado de los mismos, (b) un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es redundante con respecto al ácido nucleico de (a) o de (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c). En una forma de realización preferida, la enseñanza divulgada se refiere a una proteína o un polipéptido que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 23-2458-61 y una parte o un derivado de los mismos.

[0049] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un fragmento inmunógeno de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación. Preferiblemente, el fragmento se une a un receptor HLA humano o un anticuerpo humano. Preferentemente, un fragmento comprende una secuencia de al menos 6, particularmente, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 aminoácidos.

5 [0050] En otro aspecto, la invención se refiere a un agente que se une a un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o a una parte del mismo. En una forma de realización preferida, el agente es un anticuerpo. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o preparado con técnicas combinatorias, o un fragmento de un anticuerpo. Por otra parte, la técnica divulgada se refiere a un anticuerpo que se une de forma selectiva a un complejo de (i) un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación o una parte del mismo y (ii) una molécula del MHC, a la que se une el antígeno asociado al tumor identificado según la divulgación o la parte de mismo, de forma que el anticuerpo no se une solo a (i) o (ii). Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo natural.

10 [0051] Por otro lado, la invención se refiere a un conjugado entre un agente según la invención, que se une a un antígeno asociado al tumor identificado según la invención o a una parte del mismo, o un anticuerpo según la invención, y un agente terapéutico o diagnóstico. En una forma de realización, el agente terapéutico o diagnóstico es una toxina.

15 [0052] En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un kit para detectar la expresión o la expresión anómala de un antígeno asociado a un tumor identificado según la divulgación que comprende medios para detectar (i) el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo, (ii) el antígeno asociado al tumor o una parte de mismo, (iii) los anticuerpos que se unen al antígeno asociado al tumor o a una parte del mismo, y/o (iv) las células T que son específicas de un complejo entre el antígeno asociado al tumor o una parte del mismo y una molécula del MHC. En una forma de realización, los agentes para detectar el ácido nucleico o la parte del mismo son moléculas de ácido nucleico para la amplificación selectiva del ácido nucleico que comprenden una secuencia de 6-20 50, particularmente, 10-30, 15-30 y 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico.

25 [0053] La invención se refiere particularmente a un anticuerpo que se une de forma selectiva a una proteína o un polipéptido, en donde la proteína o el polipéptido son codificados por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 20, 21, 54, 55, 56 y 57.

30 [0054] La presente invención se refiere además a un anticuerpo que se une de forma selectiva a una proteína o un polipéptido, en donde la proteína o el polipéptido son codificados por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 19-21 y 54 a 57 para su uso en un método diagnóstico o terapéutico, en donde el método diagnóstico comprende la administración del anticuerpo y el anticuerpo del método diagnóstico se liga a un agente diagnóstico.

[0055] En una forma de realización, el anticuerpo según la invención se liga a un agente terapéutico o diagnóstico.

35 [0056] En otra forma de realización, el anticuerpo del método terapéutico se liga a un agente terapéutico.

[0057] En una forma de realización, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo.

40 [0058] En una forma de realización, el método diagnóstico o terapéutico según la invención se refiere al diagnóstico o a la terapia de una enfermedad de cáncer que se distingue por la expresión de un antígeno asociado a un tumor, en donde la enfermedad de cáncer es un carcinoma de ovario, un tumor de pulmón, un tumor de mama, un tumor de próstata, un melanoma, un carcinoma cervical o un carcinoma de mama.

[0059] En otra forma de realización, la proteína o el polipéptido, o el antígeno asociado a un tumor, comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 22, 23, 24, 58, 59, 60 y 61.

#### **Descripción detallada de la invención**

45 [0060] En el presente caso se describen genes que se expresan de forma selectiva o se expresan de forma aberrante en las células tumorales y que representan antígenos asociados al tumor.

[0061] Según la invención, estos genes o sus derivados son estructuras diana preferidas para técnicas terapéuticas. Desde el punto de vista conceptual, las fórmulas terapéuticas pueden estar orientadas a una inhibición de la actividad

del producto génico asociado al tumor expresado de forma selectiva. Ello es útil si la respectiva expresión aberrante selectiva es importante a nivel funcional en cuanto a la patogénesis del tumor y su supresión va acompañada de un daño selectivo de las células correspondientes. Otros conceptos terapéuticos consideran los antígenos asociados a tumores como marcaciones que reúnen de forma selectiva mecanismos efectores con potencial dañino para las células en las células tumorales. En este sentido, la función de la propia molécula diana y su papel en la formación del tumor son totalmente insignificantes.

[0062] Según la invención, se entiende por «derivado» de un ácido nucleico que, en el ácido nucleico, se encuentran una o múltiples sustituciones, deleciones y/o adiciones de nucleótidos. Además, el término «derivado» también comprende una obtención química de derivados de un ácido nucleico en una base nucleotídica, en el azúcar o en el fosfato. El término «derivado» también comprende ácidos nucleicos que incluyen nucleótidos y análogos de nucleótidos que no están presentes en la naturaleza.

[0063] Según la invención, un ácido nucleico es preferentemente el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos comprenden, según la invención, los ADN, ADNc y ARNm genómicos, así como las moléculas preparadas de forma recombinante y sintetizadas químicamente. Según la invención, un ácido nucleico puede encontrarse en forma de molécula monocatenaria o bicatenaria, y lineal o cerrada de forma circular covalente.

[0064] Preferentemente, los ácidos nucleicos descritos están aislados. Según la invención, el término «ácido nucleico aislado» significa que el ácido nucleico (i) se ha amplificado *in vitro*, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) se ha producido de forma recombinante mediante clonación, (iii) se ha purificado, por ejemplo, mediante escisión y separación por electroforesis en gel, o (iv) se ha sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado en un ácido nucleico que está disponible para una manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

[0065] Un ácido nucleico es «complementario» a otro ácido nucleico si las dos secuencias hibridan entre sí y pueden constituir una secuencia doble estable, de forma que la hibridación se efectúa preferentemente en condiciones que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones restrictivas). Las condiciones restrictivas se han descrito, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook et al., eds. 2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65 °C en tampones de hibridación (3,5 x SSC, 0,02 % de Ficoll, 0,02 % de polivinilpirrolidona, 0,02 % de seroalbúmina bovina, 2,5 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7), 0,5 % de SDS, 2 mM de EDTA). El SSC es 0,15 M de cloruro de sodio/ 0,15 M de citrato de sodio, pH 7. Después de la hibridación, la membrana a la que se ha transferido el ADN se lava en, por ejemplo, 2 x SSC a temperatura ambiente y, después, en 0,1 - 0,5 x SSC/ 0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68 °C.

[0066] Según la invención, los ácidos nucleicos complementarios presentan, al menos, un 40 %, particularmente, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % y, preferentemente, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de los nucleótidos.

[0067] Los ácidos nucleicos que codifican los antígenos asociados a tumores pueden encontrarse solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, particularmente, con ácidos nucleicos heterólogos. En algunas formas de realización preferidas, un ácido nucleico se encuentra enlazado funcionalmente con secuencias controladoras de la expresión o secuencias reguladoras que pueden ser homólogas o heterólogas respecto al ácido nucleico. Una secuencia codificante y una secuencia reguladora están enlazadas entre sí «de manera funcional» si están vinculadas entre sí de forma covalente de tal manera que la expresión o la transcripción de la secuencia codificante está bajo el control o bajo la influencia de la secuencia reguladora. En el caso de que la secuencia codificante se tenga que traducir a una proteína funcional, en un enlace funcional de una secuencia reguladora con la secuencia codificante, una inducción de la secuencia reguladora da lugar a una transcripción de la secuencia codificante, sin que se provoque un desplazamiento del marco de lectura en la secuencia codificante o una incapacidad de la secuencia codificante de ser traducida a la proteína o al péptido deseados.

[0068] Según la invención, el término «secuencia controladora de la expresión» o «secuencia reguladora» comprende promotores, potenciadores y otros elementos controladores que dirigen la expresión de un gen. En determinadas formas de realización según la invención, las secuencias controladoras de la expresión son regulables. La estructura exacta de las secuencias reguladoras puede variar en función de la especie o del tipo de célula, pero comprende en general secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas que participan en la iniciación de la transcripción o de la traducción, como la caja TATA, la secuencia de caperuza, la secuencia CAAT y similares. Particularmente, las secuencias reguladoras 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora

para un control transcripcional del gen enlazado de forma funcional. Las secuencias reguladoras también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras situadas antes del extremo 5' del promotor.

5 [0069] Así, los antígenos asociados al tumor mostrados en este caso pueden, por un lado, combinarse con secuencias controladoras de la expresión y promotores de forma arbitraria. No obstante, por otro lado, los promotores de los productos génicos asociados al tumor mostrados en este caso pueden combinarse según la invención con otros genes de forma arbitraria. Ello permite aprovechar la actividad selectiva de estos promotores.

10 [0070] Por otra parte, un ácido nucleico puede encontrarse enlazado a otro ácido nucleico que codifique un polipéptido que dirija una secreción desde una célula huésped de la proteína o del polipéptido codificados por el ácido nucleico. Un ácido nucleico también puede encontrarse enlazado a otro ácido nucleico que codifique un polipéptido que cause una fijación de la proteína o del polipéptido codificados en la membrana celular de la célula huésped o su compartimentalización en determinados orgánulos de esta célula.

15 [0071] En una forma de realización preferida, una molécula de ADN recombinante es un vector, en su caso, con un promotor, que dirige la expresión de un ácido nucleico, p. ej., de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado al tumor según la invención. Así, el término «vector» se usa en su sentido más general y comprende todo tipo de vehículos intermediarios de un ácido nucleico que hacen posible, p. ej., introducir el ácido nucleico en células procariotas y/o eucariotas y, en su caso, integrarlo en un genoma. Preferentemente, los vectores de este tipo se duplican y/o se expresan en la célula. Se puede adaptar un vehículo intermediario para, p. ej., su uso en la electroporación, el bombardeo con microproyectiles, la administración liposomal, en la transferencia utilizando bacterias *Agrobacterium*, o en la inserción mediante virus ADN o ARN. Los vectores comprenden plásmidos, fagómidos o genomas virales.

25 [0072] Los ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor identificado según la invención se pueden emplear para una transfección de las células huésped. Así, se entiende por ácidos nucleicos tanto el ARN como el ADN recombinante. El ARN recombinante se puede preparar por transcripción in vitro de una plantilla de ADN. Por otra parte, se puede modificar mediante secuencias estabilizantes, caperuzas y poliadenilación antes de la aplicación. Según la invención, el término «célula huésped» se refiere a cada una de las células que se puede transformar con o a la que se puede transferir un ácido nucleico exógeno. Según la invención, el término «células huésped» comprende células procariotas (p. ej., *E. coli*) o eucariotas (p. ej., células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células de levadura y células de insectos). Especialmente preferidas son las células de mamíferos, como las células del hombre, de ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células pueden proceder de una pluralidad de tipos de tejido y comprenden células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos comprenden queratinocitos, leucocitos periféricos de la sangre, células madre de la médula ósea y células madre embrionarias no humanas. En otras formas de realización, la célula huésped es una célula que presenta un antígeno, particularmente, una célula dendrítica, un monocito o un macrófago. Un ácido nucleico puede encontrarse en la célula huésped en una única o en varias copias, y se expresa en la célula huésped en una forma de realización.

35 [0073] El término «expresión» se usa en su sentido más general y comprende la producción de ARN o de ADN, y de proteínas. También comprende una expresión parcial de los ácidos nucleicos. Por otra parte, la expresión puede efectuarse de forma transitoria o estable. Los sistemas de expresión preferidos en las células de mamíferos comprenden pcDNA3.1 y pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), que incluyen un marcador seleccionable, como un gen, que proporciona una resistencia frente a G418 (y, con ello, hace posible una selección de líneas celulares transferidas de forma estable), y las secuencias promotoras potenciadoras del citomegalovirus (CMV).

45 [0074] En los casos de la enseñanza divulgada en los que una molécula HLA presenta un antígeno asociado a un tumor o una parte del mismo, un vector de expresión también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifique la molécula HLA. La secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula HLA puede encontrarse en el mismo vector de expresión que el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo, o bien los dos ácidos nucleicos pueden encontrarse en distintos vectores de expresión. En el último caso, los dos vectores de expresión se pueden transferir de forma conjunta a una célula. En el caso de que una célula huésped no exprese el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo ni la molécula de HLA, los dos ácidos nucleicos que lo codifican se transfieren a la célula, bien en el mismo vector de expresión, o bien en distintos vectores de expresión.

50 En el caso de que la célula ya exprese la molécula HLA, solo se puede transferir a la célula la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor o la parte del mismo.

[0075] Según la divulgación, se comprenden kits para la amplificación de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor. Los kits de este tipo comprenden, por ejemplo, un par de cebadores de amplificación que se

5 hibridan en el ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor. Preferentemente, los cebadores comprenden una secuencia de 6-50, particularmente, 10-30, 15-30 y 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico y no se solapan para evitar la formación de dímeros cebadores. Uno de los cebadores hibridará en una cadena del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor, y el otro cebador hibridará en la cadena complementaria en una disposición que permite una amplificación del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado al tumor.

10 [0076] Las moléculas «no codificantes» o los ácidos nucleicos «no codificantes» se pueden usar para regular, particularmente, para reducir la expresión de un ácido nucleico. Según la invención, el término «molécula no codificante» o «nucleótido no codificante» se refiere a un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, un oligorribonucleótido modificado o un oligodesoxirribonucleótido modificado, y que  
15 hibrida en un ADN que comprende un gen determinado o en un ARNm de este gen en condiciones fisiológicas, con lo que se inhibe la transcripción de este gen y/o la traducción de este ARNm. Según la invención, una «molécula no codificante» también comprende una construcción que incluye un ácido nucleico o una parte del mismo en una orientación inversa respecto a su promotor natural. Una transcripción no codificante de un ácido nucleico o de una parte del mismo puede constituir una transcripción doble con el ARNm presente de forma natural que especifica la enzima y, así, impedir una acumulación de ARNm o una traducción del mismo a la enzima activa. Otra posibilidad es el uso de ribozimas para inactivar un ácido nucleico. Los oligonucleótidos no codificantes según la invención preferidos presentan una secuencia de 6-50, particularmente, de 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos contiguos del ácido nucleico diana y, preferentemente, son completamente complementarios al ácido nucleico diana o a una parte del mismo.

20 [0077] En algunas formas de realización preferidas, el oligonucleótido no codificante hibrida con un punto N-terminal o situado en dirección 5', como un punto de iniciación de la traducción, de iniciación de la transcripción o un punto promotor. En otras formas de realización, el oligonucleótido no codificante hibrida con una región 3' no traducida o un punto de corte y empalme de ARNm.

25 [0078] En una forma de realización, según la invención, un oligonucleótido está formado por ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o una combinación de los mismos. En este caso, el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido están vinculados entre sí por un enlace fosfodiéster. Estos oligonucleótidos se pueden sintetizar de manera convencional o producir de forma recombinante.

30 [0079] En algunas formas de realización preferidas, un oligonucleótido es un oligonucleótido «modificado». En ese caso, para, por ejemplo, aumentar su estabilidad o su eficacia terapéutica, el oligonucleótido puede estar modificado de las formas más diversas sin que se vea afectada su capacidad de unirse a su diana. El término «oligonucleótido modificado» significa un oligonucleótido en el que (i) al menos dos de sus nucleótidos están vinculados entre sí mediante un enlace internucleósido sintético (esto es, un enlace internucleósido, que no es ningún enlace fosfodiéster) y/o (ii) un grupo químico está enlazado de forma covalente con un oligonucleótido que normalmente no se da en los ácidos nucleicos. Los enlaces internucleósidos sintéticos preferidos son los fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, los ésteres de fosfato, los alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidas, ésteres de carboximetilo y los péptidos.  
35

40 [0080] El término «oligonucleótido modificado» también comprende oligonucleótidos con una base modificada de forma covalente y/o azúcar. Por ejemplo, los «oligonucleótidos modificados» comprenden oligonucleótidos con restos de azúcar que se unen de forma covalente a grupos orgánicos con un peso molecular reducido que no son ningún grupo hidroxílico en la posición 3' ni ningún grupo de fosfato en la posición 5'. Los oligonucleótidos modificados pueden comprender, por ejemplo, un resto de ribosa 2'-O-alquilado u otro azúcar en lugar de la ribosa, como la arabinosa.

45 [0081] Preferentemente, las proteínas y los polipéptidos descritos están aislados. Los términos «proteína aislada» o «polipéptido aislado» significan que la proteína o el polipéptido están separados de su entorno natural. Una proteína aislada o un polipéptido aislado pueden encontrarse en un estado esencialmente purificado. El término «esencialmente purificado» significa que la proteína o el polipéptido se encuentran esencialmente exentos de otras sustancias con las que se encuentran en la naturaleza o *in vivo*.

50 [0082] Las proteínas y los polipéptidos de este tipo sirven, por ejemplo, para preparar anticuerpos y se pueden emplear en un ensayo inmunológico o diagnóstico, o como agentes terapéuticos. Según la invención, las proteínas y los polipéptidos descritos se pueden aislar de muestras biológicas, como homogeneizados de células o de tejidos, y también se pueden expresar de manera recombinante en una pluralidad de sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

[0083] Los «derivados» de una proteína o de un polipéptido, o una secuencia de aminoácidos en el sentido de esta invención comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

5 [0084] Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxiterminales, así como inserciones de uno o varios aminoácidos en una secuencia de aminoácidos determinada. En el caso de las variantes de secuencias de aminoácidos con una inserción, se introducen uno o varios restos de aminoácidos en un punto predeterminado de una secuencia de aminoácidos, si bien también es posible una inserción casual con un rastreo adecuado del producto resultante. Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o varios aminoácidos de la secuencia. Las variantes de sustitución de aminoácidos se distinguen por que se elimina al menos un resto de la secuencia y se incorpora otro resto en su lugar. Preferentemente, las modificaciones se sitúan en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas homólogas o polipéptidos. Preferentemente, los aminoácidos se sustituyen por otros con propiedades parecidas, como hidrofobia, hidrofilia, electronegatividad, volumen de la cadena lateral y similares (sustitución conservadora). Las sustituciones conservadoras se refieren, por ejemplo, al intercambio de un aminoácido por otro. A continuación, se muestran los aminoácidos del mismo grupo que el aminoácido sustituido:

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

[0085] Tres residuos se han puesto entre paréntesis debido a su importante papel en la arquitectura proteínica. El Gly es el único resto sin cadena lateral y, por ello, proporciona flexibilidad a la cadena. El Pro cuenta con una geometría inusual que limita en gran medida a la cadena. El Cys puede formar un puente disulfuro.

25 [0086] Las variantes de aminoácidos descritas más arriba se pueden preparar fácilmente utilizando técnicas de síntesis de péptidos conocidas, como p. ej., mediante «síntesis en fase sólida» (Merrifield, 1964) y métodos similares, o mediante una manipulación del ADN recombinante. Las técnicas para incorporar mutaciones de sustitución en puntos predeterminados del ADN que cuenta con una secuencia conocida o parcialmente conocida se conocen ampliamente y comprenden, p. ej., la mutagénesis mediante M13. La manipulación de las secuencias de ADN para preparar proteínas con sustituciones, inserciones o delecciones se describe detalladamente en, p. ej., Sambrook et al. (1989).

[0087] Según la invención, los «derivados» de proteínas o polipéptidos también comprenden sustituciones, delecciones y/o adiciones individuales o múltiples de las moléculas que están asociadas con la enzima, como los hidratos de carbono, los lípidos y/o las proteínas, los polipéptidos o los péptidos. Asimismo, el término «derivado» también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de las proteínas o los polipéptidos.

35 [0088] Una parte o un fragmento de un antígeno asociado a un tumor presentan una propiedad funcional del polipéptido del que deriva. Las propiedades funcionales de este tipo comprenden la interacción con anticuerpos, la interacción con otros polipéptidos o proteínas, el enlace selectivo de los ácidos nucleicos y una actividad enzimática. Una propiedad importante es la capacidad de constituir un complejo con HLA y, en su caso, activar una reacción inmunitaria. Esta reacción inmunitaria puede basarse en la estimulación de las células T citotóxicas o colaboradoras. 40 Preferentemente, una parte o un fragmento de un antígeno asociado a un tumor según la invención comprenden una secuencia de al menos 6, particularmente, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 aminoácidos contiguos del antígeno asociado al tumor.

[0089] Una parte o un fragmento de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor se refiere a la parte del ácido nucleico que codifica al menos el antígeno asociado al tumor y/o una parte o un fragmento del antígeno asociado al tumor como se ha definido anteriormente. 45

[0090] El aislamiento y la identificación de los genes que codifican antígenos asociados al tumor también hacen posible el diagnóstico de una enfermedad que se distingue por la expresión de uno o varios antígenos asociados al tumor. Estos métodos comprenden la determinación de uno o varios ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor y/o la determinación de los antígenos asociados al tumor codificados y/o de los péptidos derivados de los mismos. Una determinación del ácido nucleico se puede efectuar de manera convencional, incluida mediante la reacción en cadena de la polimerasa o la hibridación con una sonda marcada. Una determinación de los antígenos asociados a un tumor o de los péptidos derivados de los mismos se puede efectuar mediante un rastreo 50

de los antisueros del paciente para reconocer el antígeno y/o los péptidos. También se puede efectuar mediante un rastreo de las células T del paciente respecto a la especificidad del respectivo antígeno asociado al tumor.

[0091] La enseñanza divulgada también hace posible aislar proteínas que se unen a los antígenos asociados a un tumor descritos en la presente memoria, incluidos los anticuerpos y las parejas de enlace celulares de los antígenos asociados a tumores.

[0092] Según la divulgación, también se proporcionan polipéptidos «dominantemente negativos» en determinadas formas de realización, los cuales provienen de antígenos asociados a tumores. Un polipéptido dominantemente negativo es una variante inactiva de una proteína que, mediante la interacción con la maquinaria celular, desplaza la interacción de una proteína activa con la maquinaria celular o compite con la proteína activa, con lo que se reduce el efecto de la proteína activa. Por ejemplo, un receptor dominantemente negativo que se une a un ligando, pero que no produce ninguna señal en reacción al enlace del ligando, puede reducir el efecto biológico del ligando. De forma similar, una cinasa dominantemente negativa y catalíticamente inactiva que interactúa normalmente con proteínas diana, pero que no fosforila las proteínas diana, puede reducir la fosforilación de las proteínas diana en reacción a una señal celular. De forma similar, un factor de transcripción dominantemente negativo que se une a un punto promotor en la región de control de un gen, pero que no aumenta la transcripción del gen, puede reducir el efecto de un factor de transcripción normal ocupando puntos de unión del promotor sin aumentar la transcripción.

[0093] El resultado de la expresión en una célula de un polipéptido dominantemente negativo es una reducción de la función de las proteínas activas. El experto en la materia puede preparar variantes dominantemente negativas de una proteína, por ejemplo, mediante métodos de mutagénesis convencionales y valorando el efecto dominantemente negativo del polipéptido de la variante.

[0094] También se comprenden según la divulgación sustancias, como polipéptidos, que se unen a antígenos asociados a un tumor. Las sustancias de enlace de este tipo se pueden usar, p. ej., en ensayos de rastreo para una detección de los antígenos asociados al tumor y de complejos de antígenos asociados a tumores con sus parejas de enlace, así como en una purificación de los antígenos asociados al tumor y de los complejos de los mismos con sus parejas de enlace. Las sustancias de este tipo también se pueden usar para una inhibición de la actividad de los antígenos asociados al tumor, p. ej., mediante un enlace a tales antígenos.

[0095] Por ello, se comprenden según la invención sustancias de unión, como p. ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que presentan la capacidad de unirse de forma selectiva a antígenos asociados al tumor. Los anticuerpos comprenden anticuerpos policlonales y monoclonales que se preparan de forma convencional.

[0096] Se sabe que solo una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el parátipo, participa en la unión del anticuerpo a su epítipo (cp. Clark, W.R. (1986), *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991), *Essential Immunology*, 7.<sup>a</sup> edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc son, p. ej., efectores de la cascada del complemento, pero no participan en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha separado enzimáticamente la región pFc' o que se ha preparado sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')<sub>2</sub>, contiene los dos puntos de enlace a antígenos de un anticuerpo completo. De forma similar, un anticuerpo del que se ha separado enzimáticamente la región Fc o que se ha preparado sin la región Fc, denominado fragmento Fab, contiene un punto de unión a un antígeno de una molécula de un anticuerpo intacta. Por otra parte, los fragmentos Fab están formados por una cadena ligera de un anticuerpo unida de forma covalente y una parte de la cadena pesada del anticuerpo, denominada Fd. Los fragmentos Fd son los determinantes principales de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd se puede asociar con hasta diez cadenas ligeras distintas, sin modificar la especificidad del anticuerpo) y, en caso de aislamiento, los fragmentos Fd conservan la capacidad de unirse a un epítipo.

[0097] Dentro de la parte de un anticuerpo que se une a un antígeno se encuentran regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que interactúan directamente con el epítipo del antígeno y regiones de armazón (FR) que mantienen la estructura terciaria del parátipo. Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobinas IgG se encuentran cuatro regiones de armazón (FR1 a FR4) que están separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR y, particularmente, las regiones CDR3 y, aún más, la región CDR3 de la cadena pesada son las principales responsables de la especificidad de los anticuerpos.

[0098] Se sabe que las regiones distintas de CDR de un anticuerpo de mamífero se pueden sustituir por regiones parecidas de anticuerpos con la misma o con otra especificidad, de forma que se conserva la especificidad del epítipo del anticuerpo original. Ello hizo posible el desarrollo de los denominados anticuerpos «humanizados», en los que

se enlazan de forma covalente CDR distintas de las humanas con regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para preparar un anticuerpo funcional.

5 [0099] Por ejemplo, WO 92/04381 describe la preparación y el uso de anticuerpos de VSR humanizados de ratones, en los que al menos una parte de las regiones FR del ratón se sustituyó por regiones FR de origen humano. Los anticuerpos de este tipo, incluidos los fragmentos de anticuerpos intactos con una capacidad de unirse a antígenos, se suelen denominar «quimeras».

10 [0100] Según la invención, también se proporcionan fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, y Fd de anticuerpos, anticuerpos quiméricos en los que se han sustituido las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmento F(ab')<sub>2</sub> en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos de fragmento Fab en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos quiméricos de fragmento Fd en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han sustituido por secuencias homólogas humanas o no humanas. Según la invención, también están comprendidos los denominados anticuerpos monocatenarios.

20 [0101] Según la divulgación, también están comprendidos los polipéptidos que se unen de forma específica a los antígenos asociados a un tumor. Por ejemplo, se pueden proporcionar sustancias de unión de polipéptidos de este tipo mediante colecciones redundantes de péptidos que se pueden preparar sencillamente en solución de forma inmovilizada o como colecciones de expresión en la superficie de fagos. También se pueden preparar colecciones combinatorias de péptidos con uno o varios aminoácidos. Asimismo, se pueden preparar colecciones de peptoides y restos sintéticos no peptídicos.

25 [0102] La expresión en la superficie de fagos puede resultar especialmente eficaz en la identificación de péptidos de unión según la divulgación. Así, por ejemplo, se prepara una colección de fagos (utilizando, por ejemplo, el fago m13, fd o lambda) que presenta inserciones de una longitud de 4 a, aproximadamente 80 restos de aminoácidos. Después, se seleccionan fagos que soportan inserciones que se unen al antígeno asociado al tumor. Este proceso se puede repetir en varios ciclos de una reelección de fagos que se unen al antígeno asociado al tumor. Las rondas repetidas provocan una acumulación de los fagos que soportan determinadas secuencias. Se puede efectuar un análisis de las secuencias de ADN para identificar las secuencias de los polipéptidos expresados. Se puede determinar la porción lineal mínima de la secuencia que se une al antígeno asociado al tumor. También se puede usar el «sistema de doble híbrido» en levadura para identificar polipéptidos que se unen a un antígeno asociado a un tumor. Según la invención, se pueden emplear los antígenos asociados a un tumor descritos o los fragmentos de los mismos para un rastreo de las colecciones de péptidos, incluidas las colecciones de expresión en la superficie de fagos, para identificar y seleccionar parejas de enlace de péptidos de los antígenos asociados a tumores. Las moléculas de este tipo se pueden usar, por ejemplo para ensayos de rastreo, protocolos de purificación, para una interferencia con la función del antígeno asociado al tumor y para otros fines conocidos por el experto en la materia.

35 [0103] Los anticuerpos descritos anteriormente y otras moléculas de unión se pueden usar, por ejemplo, para identificar un tejido que exprese un antígeno asociado a un tumor. Los anticuerpos también se pueden ligar a sustancias diagnósticas específicas para una representación de las células y los tejidos que expresen antígenos asociados a un tumor. Asimismo, se pueden ligar a sustancias útiles desde un punto de vista terapéutico. Las sustancias diagnósticas comprenden, de forma no limitativa, sulfato de bario, ácido de iocetamina, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y productos radioactivos para diagnóstico, incluidos los emisores de positrones, como el flúor 18 y el carbono 11, los emisores de rayos gamma, como el yodo 123, el tecnecio 99m, el yodo 131 y el indio 111, así como los núclidos para la resonancia magnética nuclear, como el flúor y el gadolinio. El término «sustancia útil desde un punto de vista terapéutico» significa, según la invención, cualquier molécula terapéutica que, según se desee, se conduce de forma selectiva a una célula que exprese uno o varios antígenos asociados a un tumor, incluidos los agentes contra el cáncer, los enlaces provistos de yodo radioactivo, las toxinas, los fármacos citostáticos o citolíticos, etc. Los agentes contra el cáncer comprenden, por ejemplo, aminoglutetimida, I azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfano, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabidina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubina, daunorubicina, taxol, etopósido, fluoruracilo, interferón- $\alpha$ , lomustina, mercaptopurina, metotrexato, mitotano, procarbazona HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina. Otros agentes contra el cáncer se han descrito en, por ejemplo Goodman y Gilman, «The Pharmacological Basis of Therapeutics», 8.<sup>a</sup> edición 1990, McGraw-Hill, Inc., particularmente, Capítulo 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner)). Las toxinas pueden ser proteínas, como la proteína antiviral de hierba camán, la toxina colérica, la toxina pertussis, la

ricina, la gelonina, la abrina, la exotoxina diftérica o la exotoxina de *Pseudomonas*. Los restos de toxina también pueden ser radionúclidos emisores de alta energía, como el cobalto 60.

5 [0104] Según la invención, el término «paciente» significa un ser humano, un primate no humano u otro animal, particularmente, un mamífero, como una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro un gato o un roedor, como un ratón o una rata. En una forma de realización especialmente preferida, el paciente es un ser humano.

10 [0105] El término «enfermedad» se refiere a cualquier estado patológico en el que se expresan o se expresan de forma anómala antígenos asociados a un tumor. El término «expresión anómala» significa que la expresión está modificada, preferentemente, aumentada respecto al estado en un individuo sano. Un aumento de la expresión se refiere a un aumento de al menos el 10 %, particularmente, al menos el 20 %, al menos el 50 % o al menos el 100 %.

En una forma de realización, el antígeno asociado al tumor solo se expresa en el tejido de un individuo con la enfermedad, mientras que la expresión está reprimida en un individuo sano. Un ejemplo de una enfermedad de este tipo es el cáncer, particularmente, seminomas, melanomas, teratomas, gliomas, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón.

15 [0106] Según la invención, una muestra biológica puede ser una muestra de tejido y/o celular, y se puede obtener de forma convencional para usarla en los distintos métodos descritos en el presente documento, como mediante biopsia de tejidos, incluida la biopsia con sacabocados, y la extracción de sangre, aspirado bronquial, orina, heces u otros fluidos corporales.

20 [0107] El término «célula inmunorreactiva» significa una célula que, con la estimulación adecuada, puede madurar hasta convertirse en una célula del sistema inmunitario (como una célula B, célula T colaboradora o célula T citolítica). Las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34+, células T maduras y no maduras, así como células B maduras y no maduras. En el caso de que se desee preparar células T citolíticas o colaboradoras que reconozcan un antígeno asociado a un tumor, la célula inmunorreactiva se pone en contacto con una célula que expresa un antígeno asociado a un tumor en condiciones que favorecen una producción, diferenciación y/o selección de células T citolíticas y colaboradoras. En una exposición frente a un antígeno, la diferenciación de las progenitoras de célula T en una célula T citolítica es parecida a la selección clonal del sistema inmunitario.

25

[0108] Algunos métodos terapéuticos se basan en una reacción del sistema inmunitario de un paciente que provoca una lisis de las células que presentan un antígeno, como las células cancerosas que presentan uno o varios antígenos asociados al tumor. Así, por ejemplo, los linfocitos T citotóxicos autólogos que son específicos de un complejo de un antígeno asociado a un tumor y una molécula del MHC se administran a un paciente con una anomalía celular. Se conoce la producción *in vitro* de los linfocitos T citotóxicos de este tipo. Un ejemplo de un método para la diferenciación de las células T se encuentra en WO-A-9633265. En líneas generales, se extrae una muestra de células, como células de la sangre, del paciente, y las células se ponen en contacto con una célula que presenta el complejo y que puede activar una multiplicación de los linfocitos T citotóxicos (p. ej., células dendríticas). La célula diana puede ser una célula transferida, como una célula COS.

30

35 [0109] Estas células transferidas presentan el complejo deseado en su superficie celular y, en el caso de un contacto con los linfocitos T citotóxicos, estimulan su multiplicación. Después, los linfocitos T citotóxicos autólogos expandidos se administran al paciente.

[0110] En otro método para la selección de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno se utilizan tetrámeros fluorógenos de complejos de moléculas del MHC de clase I/péptidos para una detección de los clones específicos de los linfocitos T citotóxicos (Altman et al., *Science* 274:94-96, 1996; Dunbar et al., *Curr. Biol.* 8:413-416, 1998). Las moléculas del MHC de clase I solubles se pliegan *in vitro* en presencia de  $\beta_2$ -microglobulina y un antígeno peptídico que se une a la molécula de clase I. Después de la purificación de los complejos de MHC/péptidos, estos se marcan con biotina. Los tetrámeros se forman mezclando los complejos MHC-péptidos biotinilados con avidina marcada (p. ej., ficoeritrina) en una relación molar de 4:1. Después, los tetrámeros se ponen en contacto con linfocitos T citotóxicos, como la sangre periférica o los ganglios linfáticos. Los tetrámeros se unen a linfocitos T citotóxicos que reconocen el complejo de antígeno peptídico/MHC de clase I. Las células que se unen a los tetrámeros se pueden clasificar mediante clasificación celular basada en fluorescencia para un aislamiento de los linfocitos T citotóxicos reactivos. Después, los linfocitos T citotóxicos aislados se pueden multiplicar *in vitro*.

40

45

[0111] En un método terapéutico conocido como transferencia adoptiva (Greenberg, *J. Immunol.* 136(5):1917, 1986; Riddell et al., *Science* 257:238, 1992; Lynch et al., *Eur. J. Immunol.* 21:1403-1410, 1991; Kast et al., *Cell* 59:603-614, 1989) se combinan las células que presentan el complejo deseado (p. ej., células dendríticas) con linfocitos T citotóxicos del paciente que tratar, lo que da lugar a una multiplicación de los linfocitos T citotóxicos específicos.

50

Después, los linfocitos T citotóxicos multiplicados se administran a un paciente con una anomalía celular que se distingue por determinadas células anómalas que presentan el complejo específico. Después, los linfocitos T citotóxicos lisan las células anómalas, con lo que se consigue un efecto terapéutico deseado.

5 [0112] A menudo, solo se pueden multiplicar las células del repertorio de la célula T de un paciente con una afinidad reducida frente a un complejo específico de este tipo, puesto que las que tienen una afinidad elevada son exterminadas por el desarrollo de la tolerancia. En este caso, una alternativa puede ser una transferencia del propio receptor de la célula T. Para ello, se combinan igualmente células que presentan el complejo deseado (p. ej., células dendríticas) con linfocitos T citotóxicos de individuos sanos. Ello da lugar a una multiplicación de linfocitos T citotóxicos específicos de alta afinidad si el donante no había tenido ningún contacto hasta el momento con el complejo específico. Se clona el receptor de célula T de alta afinidad de estos linfocitos T específicos multiplicados y se puede transducir de forma arbitraria a las células T de otros pacientes mediante transferencia génica, p. ej., con vectores retrovirales. En ese momento, se efectúa la transferencia adoptiva con estos linfocitos T modificados genéticamente (Stanislowski et al., Nat Immunol. 2:962-70, 2001; Kessels et al., Nat Immunol. 2:957-61, 2001).

15 [0113] Los aspectos terapéuticos anteriores parten de que al menos algunas de las células anómalas del paciente presentan un complejo de un antígeno asociado a un tumor y una molécula HLA. Una identificación de las células de este tipo se puede desarrollar de forma conocida. Nada más identificarse las células que presentan el complejo se pueden combinar con la muestra del paciente que incluye linfocitos T citotóxicos. En el caso de que las células que presentan al complejo estén lisadas por los linfocitos T citotóxicos, se puede suponer que se presenta un antígeno asociado a un tumor.

20 [0114] La transferencia adoptiva no es el único tipo de terapia que se puede aplicar según la divulgación. Los linfocitos T citotóxicos también se pueden generar in vivo de forma conocida por sí misma. En un método se usan células no proliferativas que expresan el complejo. Las células que se usan en este caso serán aquellas que expresan normalmente el complejo, como las células tumorales tratadas con radioterapia o células a las que se han transferido uno o los dos genes que son necesarios para una presentación del complejo (esto es, el péptido antígeno y la molécula HLA presentadora). Se pueden emplear distintos tipos de células. Por otra parte, se pueden usar vectores que contienen uno o los dos genes de interés. Se prefieren especialmente los vectores virales y bacterianos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor o una parte del mismo se pueden vincular de forma funcional con secuencias promotoras y potenciadoras que dirigen una expresión del antígeno asociado al tumor o un fragmento del mismo en determinados tejidos o tipos de células. El ácido nucleico se puede integrar en el sector de expresión. Los vectores de expresión pueden ser ácidos nucleicos extracromosómicos no modificados, plásmidos o genomas virales en los que es posible una inserción de ácidos nucleicos exógenos. Los ácidos nucleicos que codifican un antígeno asociado a un tumor también se pueden insertar en un genoma retroviral, lo que hace posible la integración del ácido nucleico en el genoma del tejido diana o de la célula diana. En estos sistemas, un microorganismo, como un virus de la vaccinia, un poxvirus, un virus del herpes simple, un retrovirus o un adenovirus, soporta el gen de interés e «infecta» de facto a las células huésped. Otra forma preferida es la introducción del antígeno asociado al tumor en forma de ARN recombinante. Este se puede incorporar en las células, p. ej., mediante transferencia liposómica o mediante electroporación. Las células resultantes presentan el complejo de interés y son reconocidas por los linfocitos T citotóxicos autólogos que se multiplican después.

40 [0115] Un efecto similar se puede alcanzar combinando el antígeno asociado al tumor o un fragmento del mismo con un adyuvante para permitir una integración in vivo en células que presenten un antígeno. El antígeno asociado al tumor o un fragmento del mismo se pueden representar en forma de proteína, de ADN (p. ej., dentro de un vector) o en forma de ARN. El antígeno asociado al tumor se procesa para dar como resultado un compañero peptídico para la molécula HLA, mientras que un fragmento del mismo se puede presentar sin que sea necesario ningún otro procesamiento. Esto último se da particularmente si estos se pueden unir a las moléculas HLA. Se prefieren las formas de administración en las que el antígeno in vivo es procesado en su conjunto por una célula dendrítica, puesto que, en este caso, también pueden surgir células T colaboradoras. Estas son necesarias para una respuesta inmunitaria efectiva (Ossendorp et al., Immunol Lett. 74:75-9, 2000; Ossendorp et al., J. Exp. Med. 187:693-702, 1998). En general, una cantidad eficaz del antígeno asociado al tumor se puede administrar a un paciente, p. ej., mediante una inyección intradérmica. No obstante, la inyección también se puede efectuar de forma intraganglionar en un ganglio linfático (Maloy et al., Proc Natl Acad Sci USA 98:3299-303, 2001). También se puede efectuar en combinación con reactivos que faciliten una aceptación en las células dendríticas. Los antígenos asociados a tumores *in vivo* preferidos comprenden aquellos que reaccionan con antisueros de cáncer alógenos o con células T de muchos pacientes de cáncer. No obstante, son de especial interés aquellos contra los que no existe ninguna respuesta inmunitaria espontánea. Contra estos se pueden inducir de forma detectable respuestas inmunitarias que pueden

lisar tumores (Keogh et al., *J Immunol.* 167:787-96, 2001; Appella et al., *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1:177-84, 1995; Wentworth et al., *Mol Immunol.* 32:603-12, 1995).

5 [0116] Las composiciones farmacéuticas descritas según la invención también se pueden emplear como vacunas para la inmunización. Los términos «inmunización» o «vacunación» significan, según la invención, un aumento o activación de una reacción inmunitaria frente a un antígeno. Se pueden emplear modelos de animales para probar un efecto inmunizador frente al cáncer usando un antígeno asociado a un tumor o un ácido nucleico que lo codifique. Por ejemplo, se pueden introducir células de cáncer humanas en un ratón para crear un tumor y se pueden administrar uno o varios ácidos nucleicos que codifiquen los antígenos asociados al tumor. El efecto en las células cancerosas (por ejemplo, la reducción del tamaño del tumor) se puede medir mediante el ácido nucleico como medida de la eficacia de una inmunización.

15 [0117] Como parte de la composición para la inmunización se administran uno o varios adyuvantes a uno o varios antígenos asociados al tumor o fragmentos estimulantes de los mismos para una inducción de una reacción inmunitaria o un aumento de una reacción inmunitaria. Un adyuvante es una sustancia que se integra en el antígeno o se administra junto con este y potencia la reacción inmunitaria. Los adyuvantes pueden potenciar la reacción inmunitaria proporcionando un depósito de antígenos (extracelular o en macrófagos), activando macrófagos y/o estimulando determinados linfocitos. Los adyuvantes son conocidos y comprenden, de forma no limitativa, el monofosforil lípido A (MPL, SmithKline Beecham), las saponinas, como QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 y QS-L1 (So et al., *Mol. Cells* 7:178-186, 1997), el adyuvante de Freund incompleto, el adyuvante de Freund completo, la vitamina E, el Montanide, el alumbre, los oligonucleótidos CpG (cp. Kreig et al., *Nature* 374:546-9, 1995) y distintas emulsiones del tipo agua en aceite que se pueden preparar a partir de aceites degradables, como el escualeno y/o el tocoferol. Preferentemente, los péptidos se administran en una mezcla con DQS21/MPL. Normalmente, la relación de DQS21 a MPL es de, alrededor de 1:10 a 10:1, preferentemente, de alrededor de 1:5 a 5:1 y, particularmente, de alrededor de 1:1. Normalmente, para una administración a los seres humanos, DQS21 y MPL se encuentran en una formulación de vacuna en un intervalo de 25 alrededor de 1 µg hasta alrededor de 100 µm.

[0118] También se pueden administrar otras sustancias que estimulen una reacción inmunitaria del paciente. Por ejemplo, se pueden usar citocinas en una vacunación debido a sus propiedades reguladoras en los linfocitos. Las citocinas de este tipo comprenden, p. ej., la interleucina 12 (IL-12), de la que se ha demostrado que potencia los efectos protectores de las vacunas (cp. *Science* 268:1432-1434, 1995), el GM-CSF y la IL-18.

30 [0119] Existe una serie de uniones que potencian una reacción inmunitaria y que, por ello, se pueden emplear en una vacunación. Estas comprenden las moléculas coestimuladoras que se proporcionan en forma de proteínas o ácidos nucleicos. Las moléculas coestimuladoras de este tipo son, por ejemplo, B7-1 y B7-2 (CD80 y CD86), que se expresan en células dendríticas (DC) e interactúan con la molécula CD28 expresada en las células T. Esta interacción proporciona una coestimulación (señal 2) para una célula T estimulada por el antígeno/MHC/TCR (señal 1), con lo que se potencia la multiplicación de la célula T y la función efectora. B7 también interactúa con CTLA4 (CD152) en las células T, y algunos análisis que incluyen los ligandos CTLA4 y B7 muestran que la interacción B7-CTLA4 puede potenciar una inmunidad contra un tumor y una multiplicación de CTL (Zheng, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(11):6284-6289 (1998)).

40 [0120] Normalmente, B7 no se expresa en las células tumorales, de forma que estas no son células presentadoras de antígeno (APC) eficaces para las células T. Una inducción de la expresión de B7 haría posible que las células tumorales estimularan de forma más eficaz una multiplicación de los linfocitos T citotóxicos y una función efectora. Una coestimulación mediante una combinación de B7/IL-6/IL-12 mostró una inducción del perfil de IFN-gamma y de las citocinas Th1 en una población de células T, lo que da lugar a una actividad de las células T aún más potenciada (Gajewski et al., *J. Immunol.* 154:5637-5648 (1995)).

45 [0121] Una activación completa de los linfocitos T citotóxicos y una función efectora completa requieren una participación de las células T colaboradoras mediante la interacción entre el ligando CD40 en las células T colaboradoras y la molécula CD40 que es expresada por las células dendríticas (Ridge et al., *Nature* 393:474 (1998), Bennett et al., *Nature* 393:478 (1998), Schönberger et al., *Nature* 393:480 (1998)). El mecanismo de esta señal coestimuladora se refiere, probablemente, al aumento de la producción de B7 y de las IL-6/IL-12 asociadas por las células dendríticas (células presentadoras de antígeno). Así, la interacción CD40-CD40L complementa las interacciones de la señal 1 (antígeno/MHC-TCR) y de la señal 2 (B7-CD28).

[0122] Según las expectativas, el uso de anticuerpos anti-CD40 para una estimulación de las células dendríticas potenciaría directamente una reacción frente a los antígenos del tumor que, normalmente, se encuentran fuera del

alcance de una reacción inflamatoria o son presentados por células presentadoras de antígenos no profesionales (células tumorales). En estas situaciones no se proporcionan señales coestimuladoras de T colaboradoras y B7. Este mecanismo se podría usar en el contexto de las terapias que se basan en las células dendríticas cargadas con antígenos o en situaciones en las que no se definieron epítotos T colaboradores en precursores de TRA conocidos.

- 5 [0123] Según la divulgación también se prevé una administración de ácidos nucleicos, polipéptidos o péptidos. La administración de polipéptidos y péptidos se puede efectuar de una forma conocida por sí misma. En una forma de realización, la administración de los ácidos nucleicos se efectúa mediante métodos *ex vivo*, esto es, retirando las células de un paciente, modificación genética de las células para integrar un antígeno asociado a un tumor y reintroducción de las células modificadas en el paciente. En general, ello comprende la introducción *in vitro* de una copia funcional de un gen en las células de un paciente y la recirculación de las células modificadas genéticamente en el paciente. La copia funcional del gen se encuentra bajo el control funcional de elementos reguladores que permiten una expresión del gen en las células modificadas genéticamente. Los métodos de transfección y de transducción son conocidos por el experto en la materia. Según la divulgación se prevé también una administración *in vivo* de ácidos nucleicos utilizando vectores, como virus y liposomas orientados.
- 10
- 15 [0124] En una forma de realización preferida, se selecciona un vector viral del grupo formado por adenovirus, virus adeno-asociados, poxvirus, incluido el virus de la vaccinia y los poxvirus atenuados, el virus del bosque de Semliki, los retrovirus, los virus Sindbis y las partículas similares al virus Ty para la administración de un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a un tumor. Son especialmente preferidos los adenovirus y los retrovirus. Por lo general, los retrovirus son de replicación deficiente (es decir, son incapaces de generar partículas infecciosas).
- 20 [0125] Se pueden emplear distintos métodos para introducir ácidos nucleicos, *in vitro* o *in vivo*, en células según la invención. Los métodos de este tipo comprenden la transfección de precipitados de ácido nucleico-CaPO<sub>4</sub>, la transfección de ácidos nucleicos asociados a DEAE, la transfección o la infección con los virus anteriores que contienen los ácidos nucleicos de interés, la transfección facilitada por liposomas y similares. En determinadas formas de realización se prefiere dirigir el ácido nucleico a determinadas células. En las formas de realización de este tipo,
- 25 un vehículo que se emplee para administrar un ácido nucleico a una célula (p. ej., un retrovirus o un liposoma) puede presentar una molécula unida de manipulación dirigida. Por ejemplo, una molécula en forma de un anticuerpo que sea específico de una proteína de la membrana superficial de la célula diana o un ligando se puede integrar en el vehículo del ácido nucleico o se puede unir al mismo para un receptor de la célula diana. Los anticuerpos preferidos comprenden anticuerpos que se unen de forma selectiva a un antígeno asociado a un tumor. En el caso de que se desee una administración de un ácido nucleico mediante liposomas, se pueden integrar proteínas que se unan a una proteína de la membrana superficial asociada con la endocitosis en la formulación de los liposomas para hacer posible una manipulación dirigida y/o una aceptación. Las proteínas de este tipo comprenden proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas que son específicas de un tipo determinado de célula, los anticuerpos contra las proteínas que se internalizan, las proteínas que se dirigen a un punto intracelular y similares.
- 30
- 35 [0126] Las composiciones terapéuticas según la invención se pueden administrar en preparaciones farmacéuticamente compatibles. Las preparaciones de este tipo pueden contener concentraciones farmacéuticamente compatibles de sales, tampones, conservantes, vehículos, sustancias complementarias aumentadoras de la inmunidad, como los adyuvantes, CpG y citocinas, y, en su caso, otros principios activos terapéuticos.
- 40 [0127] Los principios activos terapéuticos según la invención se pueden administrar de cualquier manera convencional, incluida la inyección o la infusión. La administración se puede efectuar, por ejemplo, por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o transdérmica. Preferentemente, la administración terapéutica de anticuerpos se efectúa mediante un aerosol pulmonar. Preferentemente, la administración de ácidos nucleicos no codificantes se efectúa mediante una administración intravenosa lenta.
- 45 [0128] Las composiciones según la invención se administran en cantidades eficaces. Una «cantidad eficaz» se refiere a la cantidad que, sola o en combinación con otras dosis, hace que se logre una reacción deseada o un efecto deseado. En el caso de un tratamiento de una enfermedad determinada o de una afección determinada que se distinga por la expresión de uno o varios antígenos asociados a un tumor, la reacción deseada se refiere a la inhibición del desarrollo de la enfermedad. Ello comprende la desaceleración del avance de la enfermedad y,
- 50 particularmente, una interrupción del avance de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser el retraso de la aparición o un impedimento de la aparición de la enfermedad o de la afección.

[0129] Una cantidad eficaz de una composición según la invención dependerá de la afección que tratar, de la severidad de la enfermedad, de los parámetros individuales del paciente, incluidos la edad, el estado psicológico, la altura y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia complementaria (si se da el caso), la vía de administración específica y factores similares.

5 [0130] Preferentemente, las composiciones farmacéuticas según la invención son estériles y contienen una cantidad eficaz de la sustancia terapéuticamente eficaz para la generación de la reacción deseada o del efecto deseado.

[0131] Las dosis de las composiciones según la invención que se administran pueden depender de distintos parámetros, como el tipo de administración, el estado del paciente, el periodo de administración deseado, etc. En el caso de que una reacción en el paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden emplear dosis más elevadas (o dosis con una efectividad más elevada que se logren mediante otra vía de administración más localizada).

10

[0132] En general, para un tratamiento o para una generación o un aumento de una reacción inmunitaria se formulan y se administran dosis de 1 ng a 1 mg, preferentemente, de 10 ng a 100 µg del antígeno asociado al tumor. En el caso de que se desee la administración de ácidos nucleicos (ADN y ARN) que codifiquen los antígenos asociados al tumor, se formulan y administran dosis de 1 ng a 0,1 mg.

15 [0133] En general, las composiciones farmacéuticas según la invención se administran en cantidades farmacéuticamente compatibles y en composiciones farmacéuticamente compatibles. El término «farmacéuticamente compatible» se refiere a un material no tóxico que no interactúa con el efecto del principio activo de la composición farmacéutica. Por lo común, las composiciones de este tipo pueden incluir sales, tampones, conservantes, vehículos y, en su caso, otros principios activos terapéuticos. Para usarlas en medicina, las sales tienen que ser farmacéuticamente compatibles. No obstante, se pueden usar sales que no sean farmacéuticamente compatibles para preparar sales de las mismas farmacéuticamente compatibles y están comprendidas según la invención. Las sales farmacéutica y farmacológicamente compatibles de este tipo comprenden, de forma no limitadora, aquellas que se han preparado partiendo de los siguientes ácidos: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido maleico, ácido acético, ácido salicílico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido malónico, ácido succínico y similares.

20

25

Las sales farmacéuticamente compatibles también se pueden preparar como sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, como las sales sódicas, potásicas o cálcicas.

[0134] Una composición farmacéutica según la invención puede comprender un vehículo farmacéuticamente compatible. Según la invención, el término «vehículo farmacéuticamente compatible» se refiere a uno o más ingredientes de relleno, diluyentes o sustancias encapsuladas sólidas o líquidas compatibles que sean adecuadas para una administración a un ser humano. El término «vehículo» se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de tipo natural o sintetizado, en el que el componente activo se combina para facilitar una aplicación. Por lo común, los componentes de la composición farmacéutica según la invención se conciben de forma que no se produzca ninguna interacción que afecte esencialmente a la eficacia farmacéutica deseada.

30

35 [0135] Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden incluir tampones adecuados, como ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

[0136] Las composiciones farmacéuticas también pueden, en su caso, contener conservantes adecuados, como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal.

40 [0137] Habitualmente, las composiciones farmacéuticas se presentan en forma de dosis unitarias y se pueden preparar de forma conocida. Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden encontrar, por ejemplo, en forma de cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones, jarabes, elixires o en forma de emulsión.

[0138] Habitualmente, las composiciones que son adecuadas para una administración parenteral comprenden una preparación estéril acuosa o no acuosa del principio activo que, preferentemente, es isotónica respecto a la sangre del receptor. Ejemplos de vehículos y disolventes compatibles son una solución de Ringer y una solución de cloruro sódico isotónica. Además, normalmente, se emplean aceites fijados estériles como medio de solución o de suspensión.

45

[0139] La presente invención se describe de forma detallada mediante las siguientes figuras y los siguientes ejemplos meramente ilustrativos y que no deben entenderse como limitadores de la invención. El experto en la materia deducirá otras formas de realización de la descripción y los ejemplos, que también están comprendidos según la divulgación.

50

**Figuras:**

[0140]

**Fig. 1. Representación esquemática de la clonación de eCT.** La estrategia comprende la identificación de genes candidatos (GOI = «Genes of interest») en bases de datos y la puesta a prueba de estos genes mediante RT-PCR.

**Fig. 2. Composición de exón de las variantes de TPTE.** Se identificaron según la invención variantes de corte y empalme (SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57) que se expresan en tejido testicular y en tumores y presentan desplazamientos del marco de lectura y, con ello, zonas de la secuencia modificadas.

**Fig. 3. Alineación de las posibles proteínas TPTE.** Eventos de corte y empalme alternativos dan como resultado modificaciones de la proteína codificada, en donde el marco de lectura se mantiene esencialmente. Los dominios transmembranarios putativos están en negrita, el dominio catalítico está enmarcado.

**Fig. 4. Topología predicha de TPTE y localización subcelular en la superficie celular de células MCF-7** El esquema izquierdo muestra los 4 dominios transmembranarios putativos (flechas) de TPTE. Se transfirió a las células MCF-7 de forma transitoria un plásmido de expresión de TPTE. El antígeno se detectó con anticuerpos específicos de TPTE y mostró una clara colocalización con moléculas MHC I localizadas en la superficie celular.

**Ejemplos:**

**Material y métodos**

[0141] Los términos «*in silico*», «electrónico» y «clonar de forma virtual» se refieren simplemente al uso de métodos basados en bases de datos con los que se pueden simular operaciones experimentales de laboratorio.

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

**Estrategia para la determinación de CT (genes testiculares de cáncer clonados electrónicamente) basada en la prospección de datos**

[0142] Se combinaron dos estrategias *in silico*, en concreto, la búsqueda de palabras clave en GenBank y cDNA xProfiler (Fig. 1). Se realizó una búsqueda de genes candidatos de los que se indica que se expresan de forma específica en el tejido testicular utilizando el sistema ENTREZ Search and Retrieval System del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) en la base de datos GenBank (Wheeler et al., *Nucleic Acids Research* 28:10-14, 2000).

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

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

A su vez, todos los genes candidatos obtenidos de la búsqueda de palabras clave se analizaron mediante el método «electronic Northern» (eNorthern) respecto a su distribución en el tejido. El método eNorthern se basa en comparar la secuencia de un GOI con una base de datos EST (expressed sequence tag) (Adams et al., *Science* 252:1651, 1991) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se puede determinar la procedencia del tejido de cada EST obtenido como homólogo al GOI introducido y, de esta forma, mediante la suma de todos los EST se puede lograr una estimación provisional de la distribución del GOI en los tejidos. Solo se siguieron analizando los GOI que no tenían ninguna homología con los EST de los tejidos normales no testiculares, a excepción de la placenta y el tejido fetal. Para esta valoración también se tuvo en cuenta que existen bancos de ADNc indicados incorrectamente en el dominio público (Scheurle et al., *Cancer Res.* 60: 4037-4043, 2000) ([www.fau.edu/cmabb/publications/cancergenes6.htm](http://www.fau.edu/cmabb/publications/cancergenes6.htm)).

[0143] Como segundo método de prospección de datos se utilizó el cDNA xProfiler del proyecto Cancer Genome Anatomy del NCBI (<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler>) (Hillier et al., *Genome Research* 6:807-828, 1996;

Pennisi, Science 276:1023-1024, 1997). Este permite relacionar entre sí conjuntos de transcriptomas archivados en bases de datos mediante operadores lógicos. En nuestro caso, definimos un conjunto A al que se asignaron todas las colecciones de expresión preparadas de testículos, excluyendo las colecciones mixtas. Al conjunto B se le asignaron todas las colecciones de ADNc que se habían preparado partiendo de tejido normal, a excepción del tejido testicular, ovárico y fetal. En general, se utilizaron todos los bancos de ADNc, independientemente del método de preparación subyacente empleado, pero solo se admitieron aquellos con una cardinalidad de > 1000. A través del operador BUT NOT se restó digitalmente el conjunto B del conjunto A. Igualmente, el grupo de los GOI encontrados de esta forma se sometió a estudios eNorthern y se verificó mediante una investigación bibliográfica.

Esta prospección de datos combinada incluye los aproximadamente 13.000 genes de cadena completa del dominio público y, a partir de estos 140 en conjunto, predice genes con una expresión específica potencial de un órgano. Entre estos se encontraban 25 genes ya conocidos de la clase de gen CT, lo que subraya la eficiencia de nuestra estrategia.

[0144] En primer lugar, se evaluaron todos los demás genes del tejido normal mediante una RT-PCR específica. Todos los GOI que se encontraron expresados en tejidos normales no testiculares se consideraron falsos positivos y se excluyeron de los análisis posteriores. Los restantes se analizaron en un gran grupo de los más diversos tejidos tumorales. Así, los antígenos representados más abajo mostraron estar activados de forma ectópica en las células tumorales.

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

[0145] Se extrajo todo el ARN del material de tejido nativo utilizando isotiocianato de guanidinio como agente caótopo (Chomczynski & Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-9, 1987). Después de la extracción con fenol ácido y la precipitación con isopropanol, el ARN se disolvió en agua tratada con DEPC.

[0146] Se realizó una síntesis de ADNc de la primera cadena a partir de 2 a 4 µg de todo el ARN en una fórmula de reacción de 20 µl a través del Superscript II (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Como cebador se utilizó un oligonucleótido dT(18). Se comprobaron la integridad y la calidad del ADNc mediante la amplificación de p53 en una PCR de 30 ciclos (codificante CGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCG (SEQ ID NO:52, no codificante CCTAACCCAGCTGCCCAACTGTAG (SEQ ID NO:53), temperatura de hibridación 67 °C).

[0147] Se elaboró un archivo de ADNc de la primera cadena partiendo de una serie de tejidos normales y entidades tumorales. Para los estudios de expresión se amplificaron 0,5 µl de estos ADNc en una fórmula de reacción con cebadores específicos de GOI (véase más abajo) y 1 U de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen). La fórmula de reacción contenía respectivamente 0,3 mM de dNTP, por cada 0,3 µM de cada cebador, y 3 µl de 10 x tampón de reacción.

[0148] Los cebadores se seleccionaron de forma que estuviesen en 2 exones distintos, y la eliminación de la interferencia mediante ADN genómico contaminante se confirmó como la causa de los resultados falsos positivos mediante una prueba del ADN transcrito no de forma inversa como plantilla. Después de 15 minutos a 95 °C para la activación de la ADN polimerasa HotStarTaq, se realizaron 35 ciclos de PCR (1 min 94 °C, 1 min temperatura de hibridación respectiva, 2 min 72 °C y alargamiento final a 72 °C durante 6 min). Se separaron 20 µl de esta reacción en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se analizaron. Se usaron los siguientes cebadores para los análisis de expresión de los antígenos correspondientes a la temperatura de hibridación indicada.

codificante TGGATGTCACCTCTCATCCTTG (SEQ ID NO: 27),  
no codificante CCATAGTTCCTGTTCTATCTG (SEQ ID NO: 28)

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

[0149] Se cuantificó la expresión de LDHC, por ejemplo, a través de la PCR a tiempo real.

El principio de la PCR cuantitativa en tiempo real con el sistema de detección de secuencia ABI PRISM (PE Biosystems, EE. UU.) utiliza la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa Taq para la detección directa y específica de productos de PCR mediante la liberación de colorantes marcadores de la fluorescencia. Además de cebadores codificantes y no codificantes, en la PCR se emplea una sonda marcada doblemente con fluorescencia (sonda TaqMan) que hibrida en una secuencia del producto de PCR. La sonda se marca 5' con un colorante marcador (p. ej., FAM) y 3' con un colorante inhibidor (p. ej., TAMRA). Si la sonda está intacta, la proximidad espacial del marcador respecto al inhibidor suprime la emisión de la fluorescencia marcadora. Si la sonda hibrida en el producto de PCR durante la PCR, se fragmenta mediante la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa Taq y se anula la supresión de la fluorescencia marcadora. El aumento de la fluorescencia marcadora como consecuencia de la

amplificación de la diana se mide después de cada ciclo de PCR y se utiliza para la cuantificación. La cuantificación de la expresión del gen diana se efectúa de forma absoluta o relativa a la expresión de un gen control con expresión constante en los tejidos que examinar. Se calculó la expresión de LDHC después de normalizar las sondas frente al ARN 18s como el denominado gen housekeeping a través del método  $\Delta\Delta\text{-C}_t$  (PE Biosystems, EE. UU.). Las reacciones se llevaron a cabo en mezclas dobles y se determinaron en duplicados. La síntesis del ADNc se efectuó con el High Capacity cDNA Archive Kit (PE Biosystems, EE. UU.) utilizando cebadores hexámeros según las indicaciones del fabricante. Se emplearon respectivamente 5  $\mu\text{l}$  del ADNc diluido en 25  $\mu\text{l}$  del volumen total para la PCR: cebadores codificantes (GGTGTCACTTCTGTGCCTTCCT (SEQ ID NO: 48)) 300 nM; cebadores no codificantes (CGGCACCAGTTCCAACAATAG (SEQ ID NO: 49)) 300 nM; sonda TaqMan (CAAAGGTTCTCCAAATGT) 250 nM; cebador codificante ARN 18s 50 nM; cebador no codificante ARN 18s 50 nM; sonda ARN 18 s 250 nM; 12,5  $\mu\text{l}$  mezcla maestra TaqMan Universal PCR Master Mix; desnaturalización inicial 95 °C (10 min); 95 °C (15 sec); 60 °C (1 min); 40 ciclos. Mediante la amplificación de un producto de 128 bp más allá del límite del exón 1 y el exón 2 se incluyeron en la cuantificación todas las variantes de corte y empalme de LDHC descritas.

**15 Clonación y análisis de la secuencia**

[0150] Se efectuó la clonación de longitudes completas o de fragmentos génicos según los métodos convencionales. Para identificar la secuencia se amplificaron los antígenos correspondientes a través de la polimerasa pfu para la corrección de errores (Stratagene). Tras finalizar la PCR, se ligó la adenosina a través de la ADN polimerasa HotStarTaq en los extremos del amplicón para clonar los fragmentos en el vector TOPO TA según las indicaciones del fabricante.

[0151] La secuenciación se realizó a través de un servicio comercial. Las secuencias se analizaron mediante programas de predicción y algoritmos convencionales.

**Ejemplo 1:**

**Identificación de TPTE como nuevo antígeno de tumor**

[0152] Las secuencias del transcrito de TPTE (SEQ ID NO:19) y de su producto de traducción (SEQ ID NO:22) están publicadas en GenBank con el número de acceso NM\_013315 (Walker, S.M. et al., Biochem. J. 360(Pt 2):277-83, 2001; Guipponi M. et al., Hum. Genet. 107(2):127-31, 2000; Chen H. et al., Hum. Genet. 105(5):399-409, 1999). El TPTE se describió como un gen que codifica una posible tirosinofosfatasa transmembranaria con expresión testicular específica que se sitúa en la región pericentromérica de los cromosomas 21, 13, 15, 22 e Y (Chen, H. et al., Hum. Genet. 105:399-409, 1999). Análisis comparativos según la invención muestran además secuencias genómicas homólogas en los cromosomas 3 y 7.

[0153] Se generaron cebadores de PCR según la invención en función de la secuencia de TPTE (SEQ ID NO:19) (5'-TGGATGTCACTCTCATCCTTG-3' (SEQ ID NO: 27) y 5'-CCATAGTTCCTGTTCTATCTG-3' (SEQ ID NO: 28)) y se emplearon para análisis de RT-PCR (95° 15 min; 94° 1 min; 63° 1 min; 72° 1 min; 35 ciclos) en una serie de tejidos humanos. Se mostró que la expresión en tejidos normales se limita a los testículos.

[0154] Como se ha descrito para los otros eCT, se pudo mostrar según la invención que las variantes de TPTE se activan de forma ectópica en una serie de tejidos tumorales; cp. Tabla 1. Se identificaron según la invención otras variantes de corte y empalme para TPTE (SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57) que se expresan en el tejido testicular y en tumores, y presentan desplazamientos del marco de lectura y, con ello, zonas secuenciales modificadas (Fig. 2).

**Tabla 1. Expresión de TPTE en tumores**

Tejido	Total puesto a prueba	Positivo	%
Melanoma	18	9	50
Carcinomas de mama	20	4	20
Tumores colorrectales	20	0	0
Carcinomas de próstata	8	3	38
Carcinomas bronquiales	23	9	39
Carcinomas de células renales	7	0	0

Tejido	Total puesto a prueba	Positivo	%
<b>Carcinomas de ovario</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>29</b>
<b>Carcinomas de tiroides</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Carcinomas cervicales</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>17</b>
<b>Líneas celulares del melanoma</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>50</b>
<b>Líneas celulares del carcinoma bronquial</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>33</b>
<b>Líneas celulares del carcinoma de mama</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>80</b>

5 [0155] La secuencia genómica de TPTE está formada por 24 exones (número de acceso NT\_029430). El transcrito mostrado en SEQ ID NO:19 incluye todos estos exones. La variante de corte y empalme mostrada en SEQ ID NO:20 surge mediante la eliminación por corte y empalme del exón 7. La variante de corte y empalme mostrada en SEQ ID NO:21 muestra una incorporación parcial de un intrón que sigue a un exón 15. Como se puede ver de las variantes SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, también se pueden eliminar por corte y empalme de forma alternativa los exones 18, 19, 20 y 21.

10 [0156] Estos eventos de corte y empalme alternativos dan como resultado modificaciones de la proteína codificada, en donde el marco de lectura se mantiene esencialmente (Fig. 3). Por ejemplo, el producto de traducción codificado por la secuencia mostrada en SEQ ID NO:20 (SEQ ID NO:23) presenta una delección de 13 aminoácidos en comparación con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:22. El producto de traducción codificado por la secuencia mostrada en SEQ ID NO:21 (SEQ ID 24) tiene una inserción adicional en la zona central de la molécula y se diferencia de esta forma de las otras variantes en 14 aminoácidos.

15 [0157] También se modifican los productos de traducción de las variantes SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, en concreto, las proteínas SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61. Los análisis para predecir dominios funcionales dan como resultado la presencia de un dominio de tirosinfosfatasa para SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:60, pero no para SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61. Se predicen 3-4 dominios transmembranarios para todas las variantes (Fig. 3 y 4).

20 [0158] El análisis de la expresión del antígeno de TPTE con anticuerpos específicos confirmó la expresión selectiva en testículos y en una serie de distintos tumores. Además, se mostró mediante análisis de colocalización que el TPTE se localiza según la invención en la superficie celular de las células tumorales con inmunoglobinas de la clase I. Hasta el momento, el TPTE solo se había descrito como una proteína asociada a Golgi. Debido a la expresión del TPTE en la superficie celular de las células tumorales, este antígeno de tumor es adecuado según la invención como una excelente diana para el desarrollo de anticuerpos monoclonales diagnósticos y terapéuticos. Debido a la topología membranaria predicha del TPTE (Fig. 4), para este fin son particularmente adecuadas, según la invención, las zonas expuestas de forma extracelular. Según la invención, esto comprende los péptidos FTDSKLYIPLEYRS (SEQ ID NO:81) y FDIKLLRNIPRWT (SEQ ID NO:82). Además, se pudo mostrar que el TPTE promueve la migración de células tumorales. Para ello, se analizó en los denominados ensayos de migración de cámara de Boyden si células tumorales a las que se había transferido TPTE bajo el control de un promotor eucariótico y células control mostraban una migración dirigida. Así, las células a las que se había transferido TPTE presentaban según la invención en 4 ensayos independientes una migración claramente aumentada (aumentada por 3). Estos datos funcionales indican que el TPTE juega un papel esencial en la metástasis de tumores. Con ello, métodos que inhiben la actividad endógena del TPTE en células tumorales según la invención, p. ej., mediante el uso de ARN no codificante, distintos métodos de interferencia por ARN (iARN) mediante vectores de expresión o retrovirus, así como mediante el uso de pequeñas moléculas, podrían provocar una metástasis y, con ello, ser de gran relevancia desde un punto de vista terapéutico. Recientemente se pudo establecer para la tirosinfosfatasa PTEN una relación causal entre la actividad de una fosfatasa en los tumores y una migración aumentada y una metástasis mayor (Iijima y Devreotes Cell 109:599-610,2002).

#### LISTA DE SECUENCIAS

40 [0159]  
 <110> Sahin Dr., Ugur  
 Türeci Dr., Özlem  
 Koslowski Dr., Michael

# ES 2 685 053 T3

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

<130> 342-3 EPT7

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.1

5 <210> 19  
<211> 2168  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 19

gaatccgcgg ggagggcaca acagctgcta cctgaacagt ttctgacca acagttacc 60  
agcgccggac tcgctgcgcc ccggcggctc tagggacccc cggcgctac acttagctcc 120  
gcgcccgaga gaatgttgga ccgacgacac aagacctcag acttgtgtta ttctagcagc 180  
tgaacacacc ccaggctctt ctgaccggca gtggctctgg aagcagtctg gtgtatagag 240  
ttatggattc actaccagat tctactgtat gctcttgaca actatgacca caatggtcca 300  
cccacaaatg aattatcagg agtgaacca gaggcacgta tgaatgaaag tcctgatccg 360  
actgacctgg cgggagtcatt cattgagctc ggccccaatg acagtccaca gacaagtgaa 420  
tttaaaggag caaccgagga ggcacctgcg aaagaaagcc cacacacaag tgaatttaaa 480  
ggagcagccc ggggtgacacc tatcagtgaa agtgtgttag cacgactttc caagtttgaa 540  
10 gttgaagatg ctgaaaatgt tgcttcatat gacagcaaga ttaagaaaat tgtgcattca 600

ES 2 685 053 T3

attgtatcat cctttgcatt tggactatth ggagttttcc tggcttact ggatgtcact 660  
ctcatccttg ccgacctaat ttctactgac agcaaacctt atattccttt ggagtatcgt 720  
tctattttctc tagctattgc cttatttttt ctcatggatg ttcttcttcg agtatttgta 780  
gaaaggagac agcagtatth ttctgactta ttaacatth tagatactgc cattattgtg 840  
attcttctgc tggttgatgt cgtttacatt ttttttgaca ttaagttgct taggaatatt 900  
cccagatgga cacatttact tgcacttcta cgacttatta ttctgttaag aatttttcat 960  
ctgtttcatc aaaaaagaca acttgaaaag ctgataagaa ggcgggtttc agaaaacaaa 1020  
aggcgataca caagggatgg atttgaccta gacctcactt acgttacaga acgtattatt 1080  
gctatgtcat ttccatcttc tgggaaggcag tctttctata gaaatccaat caaggaagtt 1140  
gtgctgtttc tagataagaa acaccgaaac cactatcgag tctacaatct atgcagtgaa 1200  
agagcttacg atcctaagca cttccataat agggctgcta gaatcatgat tgatgatcat 1260  
aatgtcccca ctctacatca gatggtggtt ttcaccaagg aagtaaatga gtggatggct 1320  
caagatcttg aaaacatcgt agcgattcac tgtaaaggag gcacagatag aacaggaact 1380  
atggtttggt ccttccttat tgcctctgaa atatgttcaa ctgcaaagga aagcctgtat 1440  
tattttggag aaaggcgaac agataaaacc cacagcgaag aatttcaggg agtagaaact 1500  
ccttctcaga agagatatgt tgcataatth gcacaagtga aacatctcta caactggaat 1560  
ctccctccaa gacggatact cttataaaa cacttcatta tttattcgat tctctgttat 1620  
gtacgtgatc taaaaatcca aatagaaatg gagaaaaagg ttgtcttttc cactatttca 1680  
ttaggaaaat gttcgggtact tgataacatt acaacagaca aaatattaat tgatgtattc 1740  
gacggtccac ctctgtatga tgatgtgaaa gtgcagtttt tctattcgaa tcttctaca 1800  
tactatgaca attgctcatt ttacttctgg ttgcacacat cttttattga aaataacagg 1860  
ctttatctac caaaaaatga attggataat ctacataaac aaaaagcacg gagaatttat 1920  
ccatcagatt ttgccgtgga gatacttttt ggcgagaaaa tgacttccag tgatgttgta 1980  
gctggatccg attaagtata gctccccctt ccccttctgg gaaagaatta tgttctttcc 2040  
aacctgcca catgttcata taccctaat ctatcctaaa tgttcccttg aagtatttat 2100  
ttatgtttat atatgtttat acatgttctt caataaatct attacatata tataaaaaaa 2160  
aaaaaaa 2168

<210> 20

<211> 2114

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

ES 2 685 053 T3

<400> 20

gaatccgCGG ggagggcaca acagctgcta cctgaacagt ttctgacceca acagttaccc 60  
 agcgccggac tcgctgcgcc ccggcggtc tagggacccc cggcgctac acttagctcc 120  
 gcgcccgaga gaatgttga ccgacgacac aagacctcag acttgtgtta ttctagcagc 180  
 tgaacacacc ccaggctctt ctgaccggca gtggctctgg aagcagtctg gtgtatagag 240  
 ttatggattc actaccagat tctactgtat gctcttgaca actatgacca caatggcca 300  
 cccacaaatg aattatcagg agtgaacca gaggcacgta tgaatgaaag tcctgatccg 360  
 actgacctgg cgggagtcatt cattgagctc ggccccaatg acagtccaca gacaagtga 420  
 tttaaaggag caaccgagga ggcacctgcg aaagaaagtg tgtagcacg actttccaag 480  
 tttgaagttg aagatgctga aaatgttgct tcatatgaca gcaagattaa gaaaattgtg 540  
 cattcaattg tatcatcctt tgcatttga ctatttgag tttcctggt cttactggat 600  
 gtcactctca tccttgccga cctaatttc actgacagca aactttatat tcctttggag 660  
 tatcgttcta tttctctagc tattgcctta tttttctca tggatgttct tcttcgagta 720  
 tttgtagaaa ggagacagca gtattttct gacttattta acattttaga tactgccatt 780  
 attgtgattc ttctgctggt tgatgctgt tacattttt ttgacattaa gttgcttagg 840  
 aatattcca gatggacaca tttacttcca cttctacgac ttattattct gtaagaatt 900  
 tttcatctgt tcatcaaaa aagacaactt gaaaagctga taagaaggcg gtttcagaa 960  
 aacaaaaggc gatacacaag ggatggattt gacctagacc tcacttacgt tacagaacgt 1020  
 attattgcta tgcatttcc atcttctgga aggcagtctt tctatagaaa tccaatcaag 1080  
 gaagttgtgc ggtttctaga taagaaacac cgaaccact atcgagtcta caatctatgc 1140  
 agtgaagag cttacgatcc taagcacttc cataataggg tcgtagaat catgattgat 1200  
 gatcataatg tccccactct acatcagatg gtggttttca ccaaggaagt aatgagtgg 1260  
 atggctcaag atcttgaaaa catcgtagcg attcactgta aaggaggcac agatagaaca 1320  
 ggaactatgg tttgtgcctt cttattgcc tctgaaatat gttcaactgc aaaggaaagc 1380  
 ctgtattatt ttggagaaag gcgaacagat aaaaccaca gcgaaaaatt tcaggaggta 1440  
 gaaactcctt ctcagaagag atatgttgca tttttgcac aagtgaaca tctctacaac 1500

ES 2 685 053 T3

tggaatctcc ctccaagacg gataactcttt ataaaacact tcattattta ttcgattcct 1560  
 cgttatgtac gtgatctaaa aatccaaata gaaatggaga aaaagggtgt cttttccact 1620  
 atttcattag gaaaatgttc ggtacttgat aacattaca cagacaaaat attaattgat 1680  
 gtattcgacg gtccacctct gtatgatgat gtgaaagtgc agtttttcta ttcgaatcct 1740  
 cctacatact atgacaattg ctcatcttac ttctgggtgc acacatcttt tattgaaaat 1800  
 aacaggcttt atctaccaa aaatgaattg gataatctac ataaacaaaa agcacggaga 1860  
 atttatccat cagatcttgc cgtggagata ctttttggcg agaaaatgac ttccagtgat 1920  
 gttgtagctg gatccgatta agtatagctc ccccttccc ttctgggaaa gaattatggt 1980  
 ctttccaacc ctgccacatg ttcatatata ctaaactat cctaaatggt cccttgaagt 2040  
 atttatttat gtttatatat gttatacat gttcttcaat aaatctatta catatatata 2100  
 aaaaaaaaaa aaaa 2114

<210> 21

<211> 2222

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

gaatccgcgg ggagggcaca acagctgcta cctgaacagt ttctgaccca acagttacce 60  
 agcgccggac tcgctgcgcc ccggcggtc tagggacccc cggcgctac acttagctcc 120  
 gcgcccgaga gaatgttga ccgacgacac aagacctcag acttgtgtta ttctagcagc 180  
 tgaacacacc ccaggctctt ctgaccggca gtggctctgg aagcagtctg gtgtatagag 240  
 ttatggattc actaccagat tctactgtat gctcttgaca actatgacca caatgggtcca 300  
 cccacaaatg aattatcagg agtgaacca gaggcacgta tgaatgaaag tcctgatccg 360  
 actgacctgg cgggagtcac cattgagctc ggccccaatg acagtccaca gacaagtgaa 420  
 tttaaaggag caaccgagga ggcacctgca aaagaaagcc cacacacaag tgaatttaaa 480  
 ggagcagccc ggggtgtcacc tatcagtcaa agtgtgttag cacgactttc caagtttgaa 540  
 gttgaagatg ctgaaaatgt tgcttcatat gacagcaaga ttaagaaaat tgtgcattca 600  
 attgtatcat cctttgcatt tggactatct ggagttttcc tggcttact ggatgtcact 660  
 ctcatccttg ccgacctaat tttcactgac agcaaacttt atattccttt ggagtatcgt 720  
 tctatctctc tagctattgc cttatctttt ctcatggatg ttcttcttcg agtatttgta 780

ES 2 685 053 T3

gaaaggagac agcagtatth ttctgactta tttaacatth tagatactgc cattattgtg 840  
 attcttctgc tggttgatgt cgtttacatt ttttttgaca ttaagttgct taggaatatt 900  
 cccagatgga cacatthact tcgacttcta cgacttatta ttctgttaag aatthttcat 960  
 ctgthttcatc aaaaaagaca acttgaaaag ctgataagaa ggcgggtthc agaaaacaaa 1020  
 aggcgataca caagggatgg atthgaccta gacctcactt acgttacaga acgtattatt 1080  
 gctatgtcat thccatcttc tggaaggcag tctthctata gaaatccaat caaggaagtt 1140  
 gtgcbggthtc tagataagaa acaccgaaac cactatcgag tctacaatct atgcagtatg 1200  
 tacattactc tatattgtgc tactgtagat agaaaacaga thactgcacg tgaaagagct 1260  
 tacgatccta agcactthca taatagggtc gttagaatca tgattgatga tcataatgtc 1320  
 cccactctac atcagatggg ggtthtcacc aaggaagtaa atgagtggat ggctcaagat 1380  
 cttgaaaaca tcgtagcgat tcaactgtaa ggaggcacag atagaacagg aactatggth 1440  
 tgtgcctthc thattgcctc tgaaatatgt tcaactgcaa aggaaagcct gtattattht 1500  
 ggagaaaaggc gaacagataa aaccacagc gaaaaatthc agggagtaga aactcctthc 1560  
 cagaagagat atgthgcata thttgcacaa gtgaaacatc tctacaactg gaatctccct 1620  
 ccaagacgga tactcttht aaacactthc atthtttatt cgattcctcg thatgtacgt 1680  
 gatctaaaaa tccaaataga aatggagaaa aaggtthgtc thtccactat thcattagga 1740  
 aatgthtcgg tacttgataa cattacaaca gacaaaatat taattgatgt atthcagcgg 1800  
 ccacctctgt atgatgatgt gaaagtgcag thttthctatt cgaatctthc tacatactat 1860  
 gacaattgct cattthtactt ctggtthcac acatctthta thgaaaataa caggcttht 1920  
 ctaccaaaaa atgaattgga taatctacat aaacaaaaag cacggagaat thtccatca 1980  
 gatthtgccg tggagatact thttggcgag aaaaatgactt ccagtgatgt tgtagctgga 2040  
 tccgattaag tatagctccc cthtcccctt ctgggaaaga atthtgtthc thccaaccct 2100  
 gccacatgth catatathc aaatctatcc taaatgthc cthgaagat thattthtgt 2160  
 thtatathgt thatacatgt tctthcaata atctattaca tatatataaa aaaaaaaaaa 2220  
 aa 2222

<210> 22

<211> 551

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 685 053 T3

Met Asn Glu Ser Pro Asp Pro Thr Asp Leu Ala Gly Val Ile Ile Glu  
 1 5 10 15

Leu Gly Pro Asn Asp Ser Pro Gln Thr Ser Glu Phe Lys Gly Ala Thr  
 20 25 30

Glu Glu Ala Pro Ala Lys Glu Ser Pro His Thr Ser Glu Phe Lys Gly  
 35 40 45

Ala Ala Arg Val Ser Pro Ile Ser Glu Ser Val Leu Ala Arg Leu Ser  
 50 55 60

Lys Phe Glu Val Glu Asp Ala Glu Asn Val Ala Ser Tyr Asp Ser Lys  
 65 70 75 80

Ile Lys Lys Ile Val His Ser Ile Val Ser Ser Phe Ala Phe Gly Leu  
 85 90 95

Phe Gly Val Phe Leu Val Leu Leu Asp Val Thr Leu Ile Leu Ala Asp  
 100 105 110

Leu Ile Phe Thr Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Pro Leu Glu Tyr Arg Ser  
 115 120 125

Ile Ser Leu Ala Ile Ala Leu Phe Phe Leu Met Asp Val Leu Leu Arg  
 130 135 140

Val Phe Val Glu Arg Arg Gln Gln Tyr Phe Ser Asp Leu Phe Asn Ile  
 145 150 155 160

Leu Asp Thr Ala Ile Ile Val Ile Leu Leu Leu Val Asp Val Val Tyr  
 165 170 175

Ile Phe Phe Asp Ile Lys Leu Leu Arg Asn Ile Pro Arg Trp Thr His  
 180 185 190

Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Ile Ile Leu Leu Arg Ile Phe His Leu  
 195 200 205

Phe His Gln Lys Arg Gln Leu Glu Lys Leu Ile Arg Arg Arg Val Ser

ES 2 685 053 T3

210	215	220														
Glu	Asn	Lys	Arg	Arg	Tyr	Thr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asp	Leu	Asp	Leu	Thr	
225					230					235					240	
Tyr	Val	Thr	Glu	Arg	Ile	Ile	Ala	Met	Ser	Phe	Pro	Ser	Ser	Gly	Arg	
				245					250					255		
Gln	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Pro	Ile	Lys	Glu	Val	Val	Arg	Phe	Leu	Asp	
			260					265					270			
Lys	Lys	His	Arg	Asn	His	Tyr	Arg	Val	Tyr	Asn	Leu	Cys	Ser	Glu	Arg	
		275					280					285				
Ala	Tyr	Asp	Pro	Lys	His	Phe	His	Asn	Arg	Val	Val	Arg	Ile	Met	Ile	
	290					295						300				
Asp	Asp	His	Asn	Val	Pro	Thr	Leu	His	Gln	Met	Val	Val	Phe	Thr	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Val	Asn	Glu	Trp	Met	Ala	Gln	Asp	Leu	Glu	Asn	Ile	Val	Ala	Ile	
				325					330					335		
His	Cys	Lys	Gly	Gly	Thr	Asp	Arg	Thr	Gly	Thr	Met	Val	Cys	Ala	Phe	
			340					345					350			
Leu	Ile	Ala	Ser	Glu	Ile	Cys	Ser	Thr	Ala	Lys	Glu	Ser	Leu	Tyr	Tyr	
		355					360					365				
Phe	Gly	Glu	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Thr	His	Ser	Glu	Lys	Phe	Gln	Gly	
	370					375					380					
Val	Glu	Thr	Pro	Ser	Gln	Lys	Arg	Tyr	Val	Ala	Tyr	Phe	Ala	Gln	Val	
385					390					395					400	
Lys	His	Leu	Tyr	Asn	Trp	Asn	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Ile	Leu	Phe	Ile	
				405					410					415		
Lys	His	Phe	Ile	Ile	Tyr	Ser	Ile	Pro	Arg	Tyr	Val	Arg	Asp	Leu	Lys	
			420					425					430			
Ile	Gln	Ile	Glu	Met	Glu	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Ser	Thr	Ile	Ser	Leu	
		435					440					445				

ES 2 685 053 T3

Gly Lys Cys Ser Val Leu Asp Asn Ile Thr Thr Asp Lys Ile Leu Ile  
 450 455 460

Asp Val Phe Asp Gly Pro Pro Leu Tyr Asp Asp Val Lys Val Gln Phe  
 465 470 475 480

Phe Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Tyr Tyr Asp Asn Cys Ser Phe Tyr Phe  
 485 490 495

Trp Leu His Thr Ser Phe Ile Glu Asn Asn Arg Leu Tyr Leu Pro Lys  
 500 505 510

Asn Glu Leu Asp Asn Leu His Lys Gln Lys Ala Arg Arg Ile Tyr Pro  
 515 520 525

Ser Asp Phe Ala Val Glu Ile Leu Phe Gly Glu Lys Met Thr Ser Ser  
 530 535 540

Asp Val Val Ala Gly Ser Asp  
 545 550

<210> 23

<211> 533

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 23

Met Asn Glu Ser Pro Asp Pro Thr Asp Leu Ala Gly Val Ile Ile Glu  
 1 5 10 15

Leu Gly Pro Asn Asp Ser Pro Gln Thr Ser Glu Phe Lys Gly Ala Thr  
 20 25 30

Glu Glu Ala Pro Ala Lys Glu Ser Val Leu Ala Arg Leu Ser Lys Phe  
 35 40 45

Glu Val Glu Asp Ala Glu Asn Val Ala Ser Tyr Asp Ser Lys Ile Lys  
 50 55 60

Lys Ile Val His Ser Ile Val Ser Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Gly  
 65 70 75 80

ES 2 685 053 T3

Val Phe Leu Val Leu Leu Asp Val Thr Leu Ile Leu Ala Asp Leu Ile  
 85 90 95

Phe Thr Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Pro Leu Glu Tyr Arg Ser Ile Ser  
 100 105 110

Leu Ala Ile Ala Leu Phe Phe Leu Met Asp Val Leu Leu Arg Val Phe  
 115 120 125

Val Glu Arg Arg Gln Gln Tyr Phe Ser Asp Leu Phe Asn Ile Leu Asp  
 130 135 140

Thr Ala Ile Ile Val Ile Leu Leu Leu Val Asp Val Val Tyr Ile Phe  
 145 150 155 160

Phe Asp Ile Lys Leu Leu Arg Asn Ile Pro Arg Trp Thr His Leu Leu  
 165 170 175

Arg Leu Leu Arg Leu Ile Ile Leu Leu Arg Ile Phe His Leu Phe His  
 180 185 190

Gln Lys Arg Gln Leu Glu Lys Leu Ile Arg Arg Arg Val Ser Glu Asn  
 195 200 205

Lys Arg Arg Tyr Thr Arg Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Val  
 210 215 220

Thr Glu Arg Ile Ile Ala Met Ser Phe Pro Ser Ser Gly Arg Gln Ser  
 225 230 235 240

Phe Tyr Arg Asn Pro Ile Lys Glu Val Val Arg Phe Leu Asp Lys Lys  
 245 250 255

His Arg Asn His Tyr Arg Val Tyr Asn Leu Cys Ser Glu Arg Ala Tyr  
 260 265 270

Asp Pro Lys His Phe His Asn Arg Val Val Arg Ile Met Ile Asp Asp  
 275 280 285

His Asn Val Pro Thr Leu His Gln Met Val Val Phe Thr Lys Glu Val  
 290 295 300

Asn Glu Trp Met Ala Gln Asp Leu Glu Asn Ile Val Ala Ile His Cys  
 305 310 315 320

ES 2 685 053 T3

Lys Gly Gly Thr Asp Arg Thr Gly Thr Met Val Cys Ala Phe Leu Ile  
 325 330 335

Ala Ser Glu Ile Cys Ser Thr Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Tyr Phe Gly  
 340 345 350

Glu Arg Arg Thr Asp Lys Thr His Ser Glu Lys Phe Gln Gly Val Glu  
 355 360 365

Thr Pro Ser Gln Lys Arg Tyr Val Ala Tyr Phe Ala Gln Val Lys His  
 370 375 380

Leu Tyr Asn Trp Asn Leu Pro Pro Arg Arg Ile Leu Phe Ile Lys His  
 385 390 395 400

Phe Ile Ile Tyr Ser Ile Pro Arg Tyr Val Arg Asp Leu Lys Ile Gln  
 405 410 415

Ile Glu Met Glu Lys Lys Val Val Phe Ser Thr Ile Ser Leu Gly Lys  
 420 425 430

Cys Ser Val Leu Asp Asn Ile Thr Thr Asp Lys Ile Leu Ile Asp Val  
 435 440 445

Phe Asp Gly Pro Pro Leu Tyr Asp Asp Val Lys Val Gln Phe Phe Tyr  
 450 455 460

Ser Asn Leu Pro Thr Tyr Tyr Asp Asn Cys Ser Phe Tyr Phe Trp Leu  
 465 470 475 480

His Thr Ser Phe Ile Glu Asn Asn Arg Leu Tyr Leu Pro Lys Asn Glu  
 485 490 495

Leu Asp Asn Leu His Lys Gln Lys Ala Arg Arg Ile Tyr Pro Ser Asp  
 500 505 510

Phe Ala Val Glu Ile Leu Phe Gly Glu Lys Met Thr Ser Ser Asp Val  
 515 520 525

Val Ala Gly Ser Asp  
 530

<210> 24

<211> 569

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

ES 2 685 053 T3

<400> 24

Met Asn Glu Ser Pro Asp Pro Thr Asp Leu Ala Gly Val Ile Ile Glu  
 1 5 10 15

Leu Gly Pro Asn Asp Ser Pro Gln Thr Ser Glu Phe Lys Gly Ala Thr  
 20 25 30

Glu Glu Ala Pro Ala Lys Glu Ser Pro His Thr Ser Glu Phe Lys Gly  
 35 40 45

Ala Ala Arg Val Ser Pro Ile Ser Glu Ser Val Leu Ala Arg Leu Ser  
 50 55 60

Lys Phe Glu Val Glu Asp Ala Glu Asn Val Ala Ser Tyr Asp Ser Lys  
 65 70 75 80

Ile Lys Lys Ile Val His Ser Ile Val Ser Ser Phe Ala Phe Gly Leu  
 85 90 95

Phe Gly Val Phe Leu Val Leu Leu Asp Val Thr Leu Ile Leu Ala Asp  
 100 105 110

Leu Ile Phe Thr Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Pro Leu Glu Tyr Arg Ser  
 115 120 125

Ile Ser Leu Ala Ile Ala Leu Phe Phe Leu Met Asp Val Leu Leu Arg  
 130 135 140

Val Phe Val Glu Arg Arg Gln Gln Tyr Phe Ser Asp Leu Phe Asn Ile  
 145 150 155 160

Leu Asp Thr Ala Ile Ile Val Ile Leu Leu Leu Val Asp Val Val Tyr  
 165 170 175

Ile Phe Phe Asp Ile Lys Leu Leu Arg Asn Ile Pro Arg Trp Thr His  
 180 185 190

ES 2 685 053 T3

Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Ile Ile Leu Leu Arg Ile Phe His Leu  
 195 200 205

Phe His Gln Lys Arg Gln Leu Glu Lys Leu Ile Arg Arg Arg Val Ser  
 210 215 220

Glu Asn Lys Arg Arg Tyr Thr Arg Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr  
 225 230 235 240

Tyr Val Thr Glu Arg Ile Ile Ala Met Ser Phe Pro Ser Ser Gly Arg  
 245 250 255

Gln Ser Phe Tyr Arg Asn Pro Ile Lys Glu Val Val Arg Phe Leu Asp  
 260 265 270

Lys Lys His Arg Asn His Tyr Arg Val Tyr Asn Leu Cys Ser Met Tyr  
 275 280 285

Ile Thr Leu Tyr Cys Ala Thr Val Asp Arg Lys Gln Ile Thr Ala Arg  
 290 295 300

Glu Arg Ala Tyr Asp Pro Lys His Phe His Asn Arg Val Val Arg Ile  
 305 310 315 320

Met Ile Asp Asp His Asn Val Pro Thr Leu His Gln Met Val Val Phe  
 325 330 335

Thr Lys Glu Val Asn Glu Trp Met Ala Gln Asp Leu Glu Asn Ile Val  
 340 345 350

Ala Ile His Cys Lys Gly Gly Thr Asp Arg Thr Gly Thr Met Val Cys  
 355 360 365

Ala Phe Leu Ile Ala Ser Glu Ile Cys Ser Thr Ala Lys Glu Ser Leu  
 370 375 380

Tyr Tyr Phe Gly Glu Arg Arg Thr Asp Lys Thr His Ser Glu Lys Phe  
 385 390 395 400

Gln Gly Val Glu Thr Pro Ser Gln Lys Arg Tyr Val Ala Tyr Phe Ala  
 405 410 415

Gln Val Lys His Leu Tyr Asn Trp Asn Leu Pro Pro Arg Arg Ile Leu  
 420 425 430

ES 2 685 053 T3

Phe Ile Lys His Phe Ile Ile Tyr Ser Ile Pro Arg Tyr Val Arg Asp  
 435 440 445

Leu Lys Ile Gln Ile Glu Met Glu Lys Lys Val Val Phe Ser Thr Ile  
 450 455 460

Ser Leu Gly Lys Cys Ser Val Leu Asp Asn Ile Thr Thr Asp Lys Ile  
 465 470 475 480

Leu Ile Asp Val Phe Asp Gly Pro Pro Leu Tyr Asp Asp Val Lys Val  
 485 490 495

Gln Phe Phe Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Tyr Tyr Asp Asn Cys Ser Phe  
 500 505 510

Tyr Phe Trp Leu His Thr Ser Phe Ile Glu Asn Asn Arg Leu Tyr Leu  
 515 520 525

Pro Lys Asn Glu Leu Asp Asn Leu His Lys Gln Lys Ala Arg Arg Ile  
 530 535 540

Tyr Pro Ser Asp Phe Ala Val Glu Ile Leu Phe Gly Glu Lys Met Thr  
 545 550 555 560

Ser Ser Asp Val Val Ala Gly Ser Asp  
 565

- <210> 27
- <211> 21
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <400> 27
- tg gatgtcac tctcatcctt g 21
- <210> 28
- <211> 21
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <400> 28
- c catagtcc tgtctatct g 21
- <210> 48
- <211> 22
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <400> 48
- g gtgtcactt ctgtgccttc ct 22
- 20 <210> 49

## ES 2 685 053 T3

<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <400> 49  
cggcaccagt tccaacaata g 21

<210> 52  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <400> 52  
cgtgagcgct tcgagatggt ccg 23

15 <210> 53  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<400> 53  
cctaaccagc tgccaactg tag 23

20 <210> 54  
<211> 1550  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 54

ES 2 685 053 T3

atgaatgaaa gtcctgatcc gactgacctg gcgggagtca tcattgagct cggccccaat 60  
gacagtccac agacaagtga atttaaagga gcaaccgagg aggcacctgc gaaagaaagc 120  
ccacacacaa gtgaatttaa aggagcagcc cgggtgtcac ctatcagtga aagtgtgtta 180  
gcacgacttt ccaagtttga agttgaagat gctgaaaatg ttgcttcata tgacagcaag 240  
attaagaaaa ttgtgcattc aattgtatca tcctttgcat ttggactatt tggagttttc 300  
ctggtcttac tggatgtcac tctcatcctt gccgacctaa ttttactga cagcaaactt 360  
tatattcctt tggagtatcg ttctatcttct cttagctattg ccttattttt tctcatggat 420  
gttcttcttc gagtatttgt agaaaggaga cagcagtatt tttctgactt atttaacatt 480  
ttagatactg ccattattgt gattcttctg ctggttgatg tcgtttacat tttttttgac 540  
attaagttgc ttaggaatat tcccagatgg acacatttac ttcgacttct acgacttatt 600  
attctgttaa gaatttttca tctgtttcat caaaaaagac aacttgaaaa gctgataaga 660  
aggcggggtt cagaaaacaa aaggcgatac acaagggatg gatttgacct agacctcact 720  
tacgttacag aacgtattat tgctatgtca tttccatctt ctggaaggca gtctttctat 780  
agaaatccaa tcaaggaagt tgtgcggtt ctagataaga aacaccgaaa cactatcga 840  
gtctacaatc tatgcagtga aagagcttac gatcctaagc acttccataa tagggtcggt 900  
agaatcatga ttgatgatca taatgtcccc actctacatc agatgggtgg tttaccaag 960  
gaagtaaagt agtggatggc tcaagatctt gaaaacatcg tagcgattca ctgtaaagga 1020  
ggcacagata gaacaggaac tatggtttgt gccttcctta ttgcctctga aatatgttca 1080  
actgcaaagg aaagcctgta ttattttgga gaaaggcgaa cagataaaac ccacagcgaa 1140  
aaatttcagg gagtagaaac tccttctcag gttatgtacg tgatctaaaa atccaaatag 1200  
aatggagaa aaaggttgc ttttccacta tttcattagg aaaatgttcg gtacttgata 1260  
acattacaac agacaaaata ttaattgatg tattcgacgg tccacctctg tatgatgatg 1320  
tgaaagtgca gtttttctat tcgaatcttc ctacatacta tgacaattgc tcattttact 1380  
tctggttgca cacatctttt attgaaaata acaggcttta tctacaaaaa aatgaattgg 1440  
ataatctaca taacaaaaa gcacggagaa tttatccatc agattttgcc gtggagatac 1500  
tttttggcga gaaaatgact tccagtgatg ttgtagctgg atccgattaa 1550

<210> 55

<211> 1407

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 55

ES 2 685 053 T3

atgaatgaaa gtccctgatcc gactgacctg gcgggagtc tcaattgagct cggccccaat 60  
 gacagtccac agacaagtga atttaaagga gcaaccgagg aggcacctgc gaaagaaagc 120  
 ccacacacaa gtgaatttaa aggagcagcc cgggtgtcac ctatcagtga aagtgtgtta 180  
 gcacgacttt ccaagtttga agttgaagat gctgaaaatg ttgcttcata tgacagcaag 240  
 attaagaaaa ttgtgcattc aattgtatca tcctttgcat ttggactatt tggagttttc 300  
 ctggctttac tggatgtcac tctcatcctt gccgacctaa ttttactga cagcaaactt 360  
 tatattcctt tggagtatcg ttctatttct ctagctattg cttatTTTT tctcatggat 420  
 gttcttcttc gagtatttgt agaaaggaga cagcagtatt tttctgactt atttaacatt 480  
 ttagatactg ccattattgt gattcttctg ctggttgatg tcgtttacat tttttttgac 540  
 attaagttgc ttaggaatat tcccagatgg acacatttac ttcgacttct acgacttatt 600  
 attctgttaa gaatttttca tctgtttcat caaaaaagac aacttgaaaa gctgataaga 660  
 aggcggggtt cagaaaacaa aaggcgatac acaagggatg gatttgacct agacctcact 720  
 tacgttacag aacgtattat tgctatgtca tttccatctt ctggaaggca gtctttctat 780  
 agaaatccaa tcaaggaagt tgtgcggtt ctagataaga aacaccgaaa cactatcga 840  
 gtctacaatc tatgcagtga aagagcttac gatcctaagc acttccataa tagggtcggt 900  
 agaatcatga ttgatgatca taatgtcccc actctacatc agatggtggt tttaccaag 960  
 gaagtaaagtg agtggatggc tcaagatctt gaaaacatcg tagcgattca ctgtaaagga 1020  
 ggcacagggt atgtacgtga tctaaaaatc caaatagaaa tggagaaaaa ggttgtcttt 1080  
 tccactatTT cattaggaaa atgttcggta cttgataaca ttacaacaga caaaatatta 1140  
 attgatgtat tcgacgggcc acctctgtat gatgatgtga aagtgcagtt tttctattcg 1200  
 aatcttctca catactatga caattgctca ttttacttct ggttgcacac atcttttatt 1260  
 gaaaataaca ggctttatct accaaaaaat gaattggata atctacataa acaaaaagca 1320  
 cggagaatTT atccatcaga ttttgccgtg gagatacttt ttggcgagaa aatgacttcc 1380  
 agtgatggtg tagctggatc cgattaa 1407

<210> 56

<211> 1413

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 56

ES 2 685 053 T3

atgaatgaaa gtcctgatcc gactgacctg gcgggagtca tcattgagct cggccccaat 60  
 gacagtccac agacaagtga atttaaagga gcaaccgagg aggcacctgc gaaagaaagt 120  
 gtgtagcac gactttccaa gtttgaagt gaagatgctg aaaatggtgc ttcatatgac 180  
 agcaagatta agaaaattgt gcattcaatt gtatcatcct ttgcatttgg actatttggga 240  
 gttttcctgg tcttactgga tgtcactctc atccttgccg acctaatttt cactgacagc 300  
 aaactttata ttcctttgga gtatcgttct atttctctag ctattgcctt attttttctc 360  
 atggatgttc ttcttcgagt atttgtagaa aggagacagc agtatttttc tgacttattt 420  
 aacatttttag atactgccat tattgtgatt cttctgctgg ttgatgtcgt ttacattttt 480  
 tttgacatta agttgcttag gaatattccc agatggacac atttacttcg acttctacga 540  
 cttattattc tgtaagaat ttttcatctg tttcatcaaa aaagacaact tgaaaagctg 600  
 ataagaaggc gggtttcaga aaacaaaagg cgatacacia gggatggatt tgacctagac 660  
 ctcacttacg ttacagaacg tattattgct atgtcatttc catcttctgg aaggcagtct 720  
 ttctatagaa atccaatcaa ggaagttgtg cggtttctag ataagaaaca ccgaaaccac 780  
 tatcgagtct acaatctatg cagtgaaaga gcttacgatc ctaagcactt ccataatagg 840  
 gtcgtagaa tcatgattga tgatcataat gtccccactc tacatcagat ggtgggttttc 900  
 accaaggaag taaatgagtg gatggctcaa gatcttgaaa acatcgtagc gattcactgt 960  
 aaaggaggca cagatagaac aggaactatg gtttgtgcct tccttattgc ctctgaaata 1020  
 tgttcaactg caaaggaaag cctgtattat tttggagaaa ggcgaacaga taaaaccac 1080  
 agcgaaaaat ttcagggagt agaaactcct tctgtacttg ataacattac aacagacaaa 1140  
 atattaattg atgtattcga cgggccacct ctgtatgatg atgtgaaagt gcagtttttc 1200  
 tattcgaatc ttctacata ctatgacaat tgctcatttt acttctgggt gcacacatct 1260  
 tttattgaaa ataacaggct ttatctacca aaaaatgaat tggataatct acataaacia 1320  
 aaagcacgga gaatttatcc atcagatfff gccgtggaga tactttttgg cgagaaaatg 1380  
 acttccagtg atgtttagc tggatccgat taa 1413

<210> 57

<211> 1353

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 57

ES 2 685 053 T3

atgaatgaaa gtcctgatcc gactgacctg gcgggagtca tcattgagct cggccccaat 60  
 gacagtccac agacaagtga atttaaagga gcaaccgagg aggcacctgc gaaagaaagt 120  
 gtgtagcac gactttccaa gtttgaagt gaagatgctg aaaatgttgc ttcatatgac 180  
 agcaagatta agaaaattgt gcattcaatt gtatcatcct ttgcatttgg actatttggg 240  
 gttttcctgg tcttactgga tgtcactctc atccttgccg acctaatttt cactgacagc 300  
 aaactttata ttcctttgga gtatcgttct atttctctag ctattgcctt attttttctc 360  
 atggatgttc ttcttcgagt atttgtagaa aggagacagc agtatttttc tgacttattt 420  
 aacatttttag atactgccat tattgtgatt cttctgctgg ttgatgtcgt ttacattttt 480  
 tttgacatta agttgcttag gaatattccc agatggacac atttacttcg acttctacga 540  
 cttattattc tgtaagaat ttttcatctg tttcatcaaa aaagacaact tgaaaagctg 600  
 ataagaaggc gggtttcaga aaacaaaagg cgatacacia gggatggatt tgacctagac 660  
 ctcaattacg ttacagaacg tattattgct atgtcatttc catcttctgg aaggcagtct 720  
 ttctatagaa atccaatcaa ggaagttgtg cggtttctag ataagaaaca ccgaaaccac 780  
 tatcgagtct acaatctatg cagtgaaaga gcttacgatc ctaagcactt ccataatagg 840  
 gtcgttagaa tcatgattga tgatcataat gtccccactc tacatcagat ggtggttttc 900  
 accaaggaag taaatgagtg gatggctcaa gatcttgaaa acatcgtagc gattcactgt 960  
 aaaggaggca caggttatgt acgtgatcta aaaatccaaa tagaaatgga gaaaaagggt 1020  
 gtcttttcca ctatttcatt aggaaaatgt tcggtacttg ataacattac aacagacaaa 1080  
 atattaattg atgtattcga cgggccacct ctgtatgatg atgtgaaagt gcagtttttc 1140  
 tattcgaatc ttctacata ctatgacaat tgctcatttt acttctgggt gcacacatct 1200  
 tttattgaaa ataacaggct ttatctacca aaaaatgaat tggataatct acataaacia 1260  
 aaagcacgga gaatttatcc atcagatttt gccgtggaga tactttttgg cgagaaaatg 1320  
 acttccagtg atgtttagc tggatccgat taa 1353

<210> 58

<211> 395

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

ES 2 685 053 T3

Met Asn Glu Ser Pro Asp Pro Thr Asp Leu Ala Gly Val Ile Ile Glu  
 1 5 10 15

Leu Gly Pro Asn Asp Ser Pro Gln Thr Ser Glu Phe Lys Gly Ala Thr  
 20 25 30

Glu Glu Ala Pro Ala Lys Glu Ser Pro His Thr Ser Glu Phe Lys Gly  
 35 40 45

Ala Ala Arg Val Ser Pro Ile Ser Glu Ser Val Leu Ala Arg Leu Ser  
 50 55 60

Lys Phe Glu Val Glu Asp Ala Glu Asn Val Ala Ser Tyr Asp Ser Lys  
 65 70 75 80

Ile Lys Lys Ile Val His Ser Ile Val Ser Ser Phe Ala Phe Gly Leu  
 85 90 95

Phe Gly Val Phe Leu Val Leu Leu Asp Val Thr Leu Ile Leu Ala Asp  
 100 105 110

Leu Ile Phe Thr Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Pro Leu Glu Tyr Arg Ser  
 115 120 125

Ile Ser Leu Ala Ile Ala Leu Phe Phe Leu Met Asp Val Leu Leu Arg  
 130 135 140

ES 2 685 053 T3

Val Phe Val Glu Arg Arg Gln Gln Tyr Phe Ser Asp Leu Phe Asn Ile  
145 150 155 160

Leu Asp Thr Ala Ile Ile Val Ile Leu Leu Leu Val Asp Val Val Tyr  
165 170 175

Ile Phe Phe Asp Ile Lys Leu Leu Arg Asn Ile Pro Arg Trp Thr His  
180 185 190

Leu Leu Arg Leu Leu Arg Leu Ile Ile Leu Leu Arg Ile Phe His Leu  
195 200 205

Phe His Gln Lys Arg Gln Leu Glu Lys Leu Ile Arg Arg Arg Val Ser  
210 215 220

Glu Asn Lys Arg Arg Tyr Thr Arg Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr  
225 230 235 240

Tyr Val Thr Glu Arg Ile Ile Ala Met Ser Phe Pro Ser Ser Gly Arg  
245 250 255

Gln Ser Phe Tyr Arg Asn Pro Ile Lys Glu Val Val Arg Phe Leu Asp  
260 265 270

Lys Lys His Arg Asn His Tyr Arg Val Tyr Asn Leu Cys Ser Glu Arg  
275 280 285

Ala Tyr Asp Pro Lys His Phe His Asn Arg Val Val Arg Ile Met Ile  
290 295 300

Asp Asp His Asn Val Pro Thr Leu His Gln Met Val Val Phe Thr Lys  
305 310 315 320

Glu Val Asn Glu Trp Met Ala Gln Asp Leu Glu Asn Ile Val Ala Ile  
325 330 335

His Cys Lys Gly Gly Thr Asp Arg Thr Gly Thr Met Val Cys Ala Phe  
340 345 350

Leu Ile Ala Ser Glu Ile Cys Ser Thr Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Tyr  
355 360 365

Phe Gly Glu Arg Arg Thr Asp Lys Thr His Ser Glu Lys Phe Gln Gly  
370 375 380

ES 2 685 053 T3

Val Glu Thr Pro Ser Gln Val Met Tyr Val Ile  
 385 390 395

<210> 59  
 <211> 468 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 59

Met Asn Glu Ser Pro Asp Pro Thr Asp Leu Ala Gly Val Ile Ile Glu  
 1 5 10 15

Leu Gly Pro Asn Asp Ser Pro Gln Thr Ser Glu Phe Lys Gly Ala Thr  
 20 25 30

Glu Glu Ala Pro Ala Lys Glu Ser Pro His Thr Ser Glu Phe Lys Gly  
 35 40 45

Ala Ala Arg Val Ser Pro Ile Ser Glu Ser Val Leu Ala Arg Leu Ser  
 50 55 60

Lys Phe Glu Val Glu Asp Ala Glu Asn Val Ala Ser Tyr Asp Ser Lys  
 65 70 75 80

Ile Lys Lys Ile Val His Ser Ile Val Ser Ser Phe Ala Phe Gly Leu  
 85 90 95

Phe Gly Val Phe Leu Val Leu Leu Asp Val Thr Leu Ile Leu Ala Asp  
 100 105 110

Leu Ile Phe Thr Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Pro Leu Glu Tyr Arg Ser  
 115 120 125

Ile Ser Leu Ala Ile Ala Leu Phe Phe Leu Met Asp Val Leu Leu Arg  
 130 135 140

Val Phe Val Glu Arg Arg Gln Gln Tyr Phe Ser Asp Leu Phe Asn Ile  
 145 150 155 160

Leu Asp Thr Ala Ile Ile Val Ile Leu Leu Leu Val Asp Val Val Tyr

ES 2 685 053 T3

				165						170						175
Ile	Phe	Phe	Asp	Ile	Lys	Leu	Leu	Arg	Asn	Ile	Pro	Arg	Trp	Thr	His	
			180					185					190			
Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Arg	Ile	Phe	His	Leu	
		195					200					205				
Phe	His	Gln	Lys	Arg	Gln	Leu	Glu	Lys	Leu	Ile	Arg	Arg	Arg	Val	Ser	
	210					215					220					
Glu	Asn	Lys	Arg	Arg	Tyr	Thr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asp	Leu	Asp	Leu	Thr	
225					230					235					240	
Tyr	Val	Thr	Glu	Arg	Ile	Ile	Ala	Met	Ser	Phe	Pro	Ser	Ser	Gly	Arg	
				245					250						255	
Gln	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Pro	Ile	Lys	Glu	Val	Val	Arg	Phe	Leu	Asp	
			260					265					270			
Lys	Lys	His	Arg	Asn	His	Tyr	Arg	Val	Tyr	Asn	Leu	Cys	Ser	Glu	Arg	
		275					280					285				
Ala	Tyr	Asp	Pro	Lys	His	Phe	His	Asn	Arg	Val	Val	Arg	Ile	Met	Ile	
	290					295						300				
Asp	Asp	His	Asn	Val	Pro	Thr	Leu	His	Gln	Met	Val	Val	Phe	Thr	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Val	Asn	Glu	Trp	Met	Ala	Gln	Asp	Leu	Glu	Asn	Ile	Val	Ala	Ile	
				325					330					335		
His	Cys	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Tyr	Val	Arg	Asp	Leu	Lys	Ile	Gln	Ile	
			340					345					350			
Glu	Met	Glu	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Ser	Thr	Ile	Ser	Leu	Gly	Lys	Cys	
		355					360					365				
Ser	Val	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Thr	Asp	Lys	Ile	Leu	Ile	Asp	Val	Phe	
	370					375					380					
Asp	Gly	Pro	Pro	Leu	Tyr	Asp	Asp	Val	Lys	Val	Gln	Phe	Phe	Tyr	Ser	
385					390					395					400	

ES 2 685 053 T3

Asn Leu Pro Thr Tyr Tyr Asp Asn Cys Ser Phe Tyr Phe Trp Leu His  
405 410 415

Thr Ser Phe Ile Glu Asn Asn Arg Leu Tyr Leu Pro Lys Asn Glu Leu  
420 425 430

Asp Asn Leu His Lys Gln Lys Ala Arg Arg Ile Tyr Pro Ser Asp Phe  
435 440 445

Ala Val Glu Ile Leu Phe Gly Glu Lys Met Thr Ser Ser Asp Val Val  
450 455 460

Ala Gly Ser Asp  
465

<210> 60

<211> 470

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 60

ES 2 685 053 T3

Met Asn Glu Ser Pro Asp Pro Thr Asp Leu Ala Gly Val Ile Ile Glu  
1 5 10 15

Leu Gly Pro Asn Asp Ser Pro Gln Thr Ser Glu Phe Lys Gly Ala Thr  
20 25 30

Glu Glu Ala Pro Ala Lys Glu Ser Val Leu Ala Arg Leu Ser Lys Phe  
35 40 45

Glu Val Glu Asp Ala Glu Asn Val Ala Ser Tyr Asp Ser Lys Ile Lys  
50 55 60

Lys Ile Val His Ser Ile Val Ser Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Gly  
65 70 75 80

Val Phe Leu Val Leu Leu Asp Val Thr Leu Ile Leu Ala Asp Leu Ile  
85 90 95

Phe Thr Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Pro Leu Glu Tyr Arg Ser Ile Ser  
100 105 110

ES 2 685 053 T3

Leu Ala Ile Ala Leu Phe Phe Leu Met Asp Val Leu Leu Arg Val Phe  
 115 120 125

Val Glu Arg Arg Gln Gln Tyr Phe Ser Asp Leu Phe Asn Ile Leu Asp  
 130 135 140

Thr Ala Ile Ile Val Ile Leu Leu Leu Val Asp Val Val Tyr Ile Phe  
 145 150 155 160

Phe Asp Ile Lys Leu Leu Arg Asn Ile Pro Arg Trp Thr His Leu Leu  
 165 170 175

Arg Leu Leu Arg Leu Ile Ile Leu Leu Arg Ile Phe His Leu Phe His  
 180 185 190

Gln Lys Arg Gln Leu Glu Lys Leu Ile Arg Arg Arg Val Ser Glu Asn  
 195 200 205

Lys Arg Arg Tyr Thr Arg Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Val  
 210 215 220

Thr Glu Arg Ile Ile Ala Met Ser Phe Pro Ser Ser Gly Arg Gln Ser  
 225 230 235 240

Phe Tyr Arg Asn Pro Ile Lys Glu Val Val Arg Phe Leu Asp Lys Lys  
 245 250 255

His Arg Asn His Tyr Arg Val Tyr Asn Leu Cys Ser Glu Arg Ala Tyr  
 260 265 270

Asp Pro Lys His Phe His Asn Arg Val Val Arg Ile Met Ile Asp Asp  
 275 280 285

His Asn Val Pro Thr Leu His Gln Met Val Val Phe Thr Lys Glu Val  
 290 295 300

Asn Glu Trp Met Ala Gln Asp Leu Glu Asn Ile Val Ala Ile His Cys  
 305 310 315 320

Lys Gly Gly Thr Asp Arg Thr Gly Thr Met Val Cys Ala Phe Leu Ile  
 325 330 335

Ala Ser Glu Ile Cys Ser Thr Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Tyr Phe Gly  
 340 345 350

ES 2 685 053 T3

Glu Arg Arg Thr Asp Lys Thr His Ser Glu Lys Phe Gln Gly Val Glu  
 355 360 365

Thr Pro Ser Val Leu Asp Asn Ile Thr Thr Asp Lys Ile Leu Ile Asp  
 370 375 380

Val Phe Asp Gly Pro Pro Leu Tyr Asp Asp Val Lys Val Gln Phe Phe  
 385 390 395 400

Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Tyr Tyr Asp Asn Cys Ser Phe Tyr Phe Trp  
 405 410 415

Leu His Thr Ser Phe Ile Glu Asn Asn Arg Leu Tyr Leu Pro Lys Asn  
 420 425 430

Glu Leu Asp Asn Leu His Lys Gln Lys Ala Arg Arg Ile Tyr Pro Ser  
 435 440 445

Asp Phe Ala Val Glu Ile Leu Phe Gly Glu Lys Met Thr Ser Ser Asp  
 450 455 460

Val Val Ala Gly Ser Asp  
 465 470

<210> 61

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 61

Met Asn Glu Ser Pro Asp Pro Thr Asp Leu Ala Gly Val Ile Ile Glu  
 1 5 10 15

Leu Gly Pro Asn Asp Ser Pro Gln Thr Ser Glu Phe Lys Gly Ala Thr  
 20 25 30

Glu Glu Ala Pro Ala Lys Glu Ser Val Leu Ala Arg Leu Ser Lys Phe  
 35 40 45

Glu Val Glu Asp Ala Glu Asn Val Ala Ser Tyr Asp Ser Lys Ile Lys

ES 2 685 053 T3

50

55

60

Lys Ile Val His Ser Ile Val Ser Ser Phe Ala Phe Gly Leu Phe Gly  
65 70 75 80

Val Phe Leu Val Leu Leu Asp Val Thr Leu Ile Leu Ala Asp Leu Ile  
85 90 95

Phe Thr Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Pro Leu Glu Tyr Arg Ser Ile Ser  
100 105 110

Leu Ala Ile Ala Leu Phe Phe Leu Met Asp Val Leu Leu Arg Val Phe  
115 120 125

Val Glu Arg Arg Gln Gln Tyr Phe Ser Asp Leu Phe Asn Ile Leu Asp  
130 135 140

Thr Ala Ile Ile Val Ile Leu Leu Leu Val Asp Val Val Tyr Ile Phe  
145 150 155 160

Phe Asp Ile Lys Leu Leu Arg Asn Ile Pro Arg Trp Thr His Leu Leu  
165 170 175

Arg Leu Leu Arg Leu Ile Ile Leu Leu Arg Ile Phe His Leu Phe His  
180 185 190

Gln Lys Arg Gln Leu Glu Lys Leu Ile Arg Arg Arg Val Ser Glu Asn  
195 200 205

Lys Arg Arg Tyr Thr Arg Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Val  
210 215 220

Thr Glu Arg Ile Ile Ala Met Ser Phe Pro Ser Ser Gly Arg Gln Ser  
225 230 235 240

Phe Tyr Arg Asn Pro Ile Lys Glu Val Val Arg Phe Leu Asp Lys Lys  
245 250 255

His Arg Asn His Tyr Arg Val Tyr Asn Leu Cys Ser Glu Arg Ala Tyr  
260 265 270

Asp Pro Lys His Phe His Asn Arg Val Val Arg Ile Met Ile Asp Asp  
275 280 285

ES 2 685 053 T3

His Asn Val Pro Thr Leu His Gln Met Val Val Phe Thr Lys Glu Val  
 290 295 300

Asn Glu Trp Met Ala Gln Asp Leu Glu Asn Ile Val Ala Ile His Cys  
 305 310 315 320

Lys Gly Gly Thr Gly Tyr Val Arg Asp Leu Lys Ile Gln Ile Glu Met  
 325 330 335

Glu Lys Lys Val Val Phe Ser Thr Ile Ser Leu Gly Lys Cys Ser Val  
 340 345 350

Leu Asp Asn Ile Thr Thr Asp Lys Ile Leu Ile Asp Val Phe Asp Gly  
 355 360 365

Pro Pro Leu Tyr Asp Asp Val Lys Val Gln Phe Phe Tyr Ser Asn Leu  
 370 375 380

Pro Thr Tyr Tyr Asp Asn Cys Ser Phe Tyr Phe Trp Leu His Thr Ser  
 385 390 395 400

Phe Ile Glu Asn Asn Arg Leu Tyr Leu Pro Lys Asn Glu Leu Asp Asn  
 405 410 415

Leu His Lys Gln Lys Ala Arg Arg Ile Tyr Pro Ser Asp Phe Ala Val  
 420 425 430

Glu Ile Leu Phe Gly Glu Lys Met Thr Ser Ser Asp Val Val Ala Gly  
 435 440 445

Ser Asp  
 450

<210> 81  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 81

Phe Thr Asp Ser Lys Leu Tyr Ile Pro Leu Glu Tyr Arg Ser  
 1 5 10

<210> 82  
 <211> 13  
 10 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 82

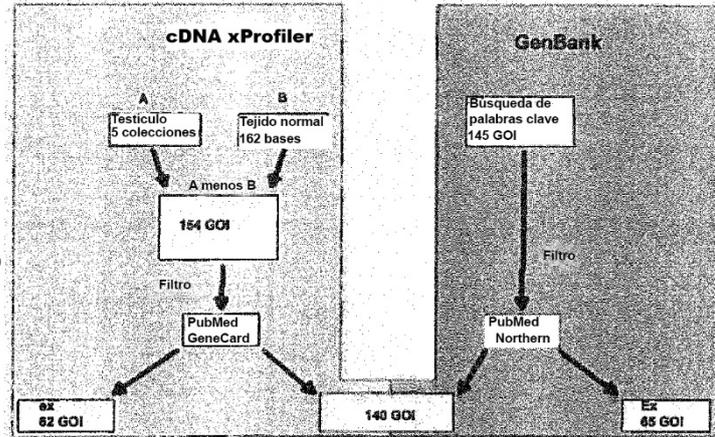


**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo que se une de forma selectiva a una proteína o un polipéptido, en donde la proteína o el polipéptido son codificados por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 20, 21, 54, 55, 56 y 57.
- 5 2. Anticuerpo que se une de forma selectiva a una proteína o un polipéptido, en donde la proteína o el polipéptido son codificados por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 19-21 y 54 a 57 para su uso en un método diagnóstico o terapéutico, en donde el método diagnóstico comprende la administración del anticuerpo y el anticuerpo del método diagnóstico se liga a un agente diagnóstico.
- 10 3. Anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se liga a un agente terapéutico o diagnóstico.
4. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 2, en donde el anticuerpo del método terapéutico se liga a un agente terapéutico.
5. Anticuerpo según la reivindicación 1 o anticuerpo para su uso según una de las reivindicaciones 2 o 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo.
- 15 6. Anticuerpo para su uso según una de las reivindicaciones 2, 4 o 5, en donde el método diagnóstico o terapéutico se refiere al diagnóstico o al tratamiento de una enfermedad de cáncer que se distingue por la expresión de un antígeno asociado a un tumor y la enfermedad de cáncer es un carcinoma de ovario, un tumor de pulmón, un tumor de mama, un tumor de próstata, un melanoma, un carcinoma cervical o un carcinoma de mama.
- 20 7. Anticuerpo para su uso según una de las reivindicaciones 2 o 4 a 6, en donde la proteína o el polipéptido, o el antígeno asociado a un tumor, comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 22, 23, 24, 58, 59, 60 y 61.

## IN SILICO

- Identificación de antígenos específicos de testículo en el conjunto total de libre acceso de genes de longitud completa



## EN LABORATORIO

- Validación de la especificidad de testículo
- Análisis de genes específicos de testículo en tumores

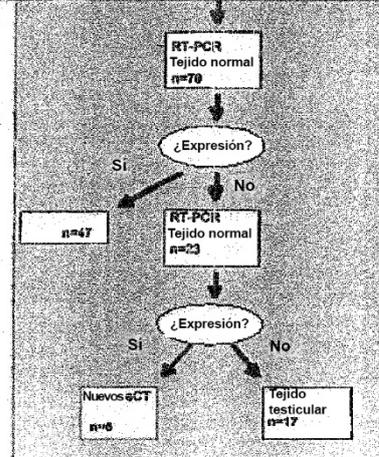


Fig. 1

Variantes de corte y empalme de TPTE

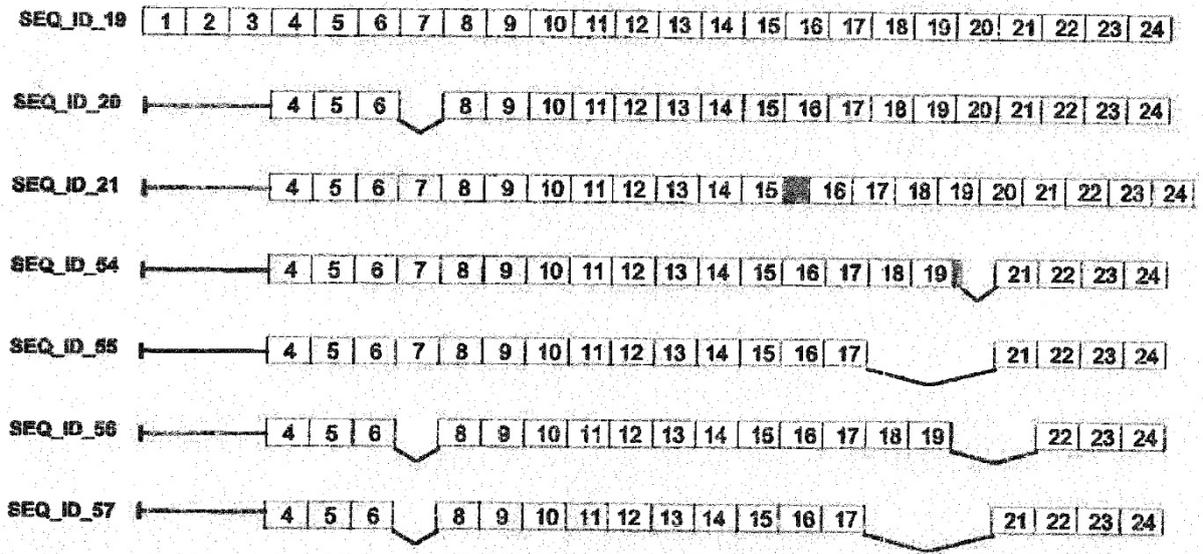


Fig. 2

SEQ_ID_19	MNESPOPTDLAGVI IELGPNDSPTSEFNGATEAPAKESPHTESEFGAARVSPISESVL	60
SEQ_ID_20	MNESPOPTDLAGVI IELGPNDSPTSEFNGATEAPAKES -----VL	62
SEQ_ID_21	MNESPOPTDLAGVI IELGPNDSPTSEFNGATEAPAKESPHTESEFGAARVSPISESVL	66
SEQ_ID_58	MNESPOPTDLAGVI IELGPNDSPTSEFNGATEAPAKESPHTESEFGAARVSPISESVL	60
SEQ_ID_59	MNESPOPTDLAGVI IELGPNDSPTSEFNGATEAPAKESPHTESEFGAARVSPISESVL	60
SEQ_ID_60	MNESPOPTDLAGVI IELGPNDSPTSEFNGATEAPAKES -----VL	62
SEQ_ID_61	MNESPOPTDLAGVI IELGPNDSPTSEFNGATEAPAKES -----VL	43
SEQ_ID_19	ARLSKFEVEDAENVASYDSKIKKIVBSIVSSAFGLGQVFLVLDVTLILAOLITFOSKL	120
SEQ_ID_20	ARLSKFEVEDAENVASYDSKIKKIVBSIVSSAFGLGQVFLVLDVTLILAOLITFOSKL	102
SEQ_ID_21	ARLSKFEVEDAENVASYDSKIKKIVBSIVSSAFGLGQVFLVLDVTLILAOLITFOSKL	120
SEQ_ID_58	ARLSKFEVEDAENVASYDSKIKKIVBSIVSSAFGLGQVFLVLDVTLILAOLITFOSKL	120
SEQ_ID_59	ARLSKFEVEDAENVASYDSKIKKIVBSIVSSAFGLGQVFLVLDVTLILAOLITFOSKL	120
SEQ_ID_60	ARLSKFEVEDAENVASYDSKIKKIVBSIVSSAFGLGQVFLVLDVTLILAOLITFOSKL	102
SEQ_ID_61	ARLSKFEVEDAENVASYDSKIKKIVBSIVSSAFGLGQVFLVLDVTLILAOLITFOSKL	102
SEQ_ID_19	YTFLEYRSTSLAALFFLMDVLLRVFVERAQYFSDLMWLDZAIIVILLLDVVYTFD	180
SEQ_ID_20	YTFLEYRSTSLAALFFLMDVLLRVFVERAQYFSDLMWLDZAIIVILLLDVVYTFD	162
SEQ_ID_21	YTFLEYRSTSLAALFFLMDVLLRVFVERAQYFSDLMWLDZAIIVILLLDVVYTFD	180
SEQ_ID_58	YTFLEYRSTSLAALFFLMDVLLRVFVERAQYFSDLMWLDZAIIVILLLDVVYTFD	180
SEQ_ID_59	YTFLEYRSTSLAALFFLMDVLLRVFVERAQYFSDLMWLDZAIIVILLLDVVYTFD	160
SEQ_ID_60	YTFLEYRSTSLAALFFLMDVLLRVFVERAQYFSDLMWLDZAIIVILLLDVVYTFD	162
SEQ_ID_61	YTFLEYRSTSLAALFFLMDVLLRVFVERAQYFSDLMWLDZAIIVILLLDVVYTFD	162
SEQ_ID_19	IKLLANI PRNTELLRLRLIILRIIFELFQKROLEKLIARRVSEKRRYTRDGFOLDL	240
SEQ_ID_20	IKLLANI PRNTELLRLRLIILRIIFELFQKROLEKLIARRVSEKRRYTRDGFOLDL	222
SEQ_ID_21	IKLLANI PRNTELLRLRLIILRIIFELFQKROLEKLIARRVSEKRRYTRDGFOLDL	240
SEQ_ID_58	IKLLANI PRNTELLRLRLIILRIIFELFQKROLEKLIARRVSEKRRYTRDGFOLDL	240
SEQ_ID_59	IKLLANI PRNTELLRLRLIILRIIFELFQKROLEKLIARRVSEKRRYTRDGFOLDL	240
SEQ_ID_60	IKLLANI PRNTELLRLRLIILRIIFELFQKROLEKLIARRVSEKRRYTRDGFOLDL	222
SEQ_ID_61	IKLLANI PRNTELLRLRLIILRIIFELFQKROLEKLIARRVSEKRRYTRDGFOLDL	222
SEQ_ID_19	YVTERIAMSFPSSGRQSFYRNPKEVVRFLDKKRRNYRVYNLCS -----	266
SEQ_ID_20	YVTERIAMSFPSSGRQSFYRNPKEVVRFLDKKRRNYRVYNLCS -----	266
SEQ_ID_21	YVTERIAMSFPSSGRQSFYRNPKEVVRFLDKKRRNYRVYNLCSMYITLCAVDRQ	308
SEQ_ID_58	YVTERIAMSFPSSGRQSFYRNPKEVVRFLDKKRRNYRVYNLCS -----	266
SEQ_ID_59	YVTERIAMSFPSSGRQSFYRNPKEVVRFLDKKRRNYRVYNLCS -----	266
SEQ_ID_60	YVTERIAMSFPSSGRQSFYRNPKEVVRFLDKKRRNYRVYNLCS -----	266
SEQ_ID_61	YVTERIAMSFPSSGRQSFYRNPKEVVRFLDKKRRNYRVYNLCS -----	266
SEQ_ID_19	----ERAYDPKHFHRVVRIMIDDNVPTLHQVVFTRKVENMAQOLENVAIHCXGGT	342
SEQ_ID_20	----ERAYDPKHFHRVVRIMIDDNVPTLHQVVFTRKVENMAQOLENVAIHCXGGT	324
SEQ_ID_21	ITAREAYDPKHFHRVVRIMIDDNVPTLHQVVFTRKVENMAQOLENVAIHCXGGT	360
SEQ_ID_58	----ERAYDPKHFHRVVRIMIDDNVPTLHQVVFTRKVENMAQOLENVAIHCXGGT	342
SEQ_ID_59	----ERAYDPKHFHRVVRIMIDDNVPTLHQVVFTRKVENMAQOLENVAIHCXGGT	342
SEQ_ID_60	----ERAYDPKHFHRVVRIMIDDNVPTLHQVVFTRKVENMAQOLENVAIHCXGGT	324
SEQ_ID_61	----ERAYDPKHFHRVVRIMIDDNVPTLHQVVFTRKVENMAQOLENVAIHCXGGT	324
SEQ_ID_19	DRGTGACAPLIASEICSTAKESLYYFGERRTDKTHERKFGVETPSQRKYVAYFAQVK	402
SEQ_ID_20	DRGTGACAPLIASEICSTAKESLYYFGERRTDKTHERKFGVETPSQRKYVAYFAQVK	384
SEQ_ID_21	DRGTGACAPLIASEICSTAKESLYYFGERRTDKTHERKFGVETPSQRKYVAYFAQVK	420
SEQ_ID_58	DRGTGACAPLIASEICSTAKESLYYFGERRTDKTHERKFGVETPSQRKYVAYFAQVK	396
SEQ_ID_59	DRGTGACAPLIASEICSTAKESLYYFGERRTDKTHERKFGVETPSQRKYVAYFAQVK	342
SEQ_ID_60	DRGTGACAPLIASEICSTAKESLYYFGERRTDKTHERKFGVETPSQRKYVAYFAQVK	370
SEQ_ID_61	G-----	325
SEQ_ID_19	LYNWHLPFRILFKHFIIYSIPRYVRLKIQIEMERKVVFTISLGCQVLDNITTDKI	462
SEQ_ID_20	LYNWHLPFRILFKHFIIYSIPRYVRLKIQIEMERKVVFTISLGCQVLDNITTDKI	444
SEQ_ID_21	LYNWHLPFRILFKHFIIYSIPRYVRLKIQIEMERKVVFTISLGCQVLDNITTDKI	480
SEQ_ID_58	-----	-----
SEQ_ID_59	-----	-----
SEQ_ID_60	-----	-----
SEQ_ID_61	-----	-----
SEQ_ID_19	LIDVFDGPPPLYDDVQVQFFYSNLPTYYDNCSFYFWLATSFTIENRRLYLPKNELDNLRQK	522
SEQ_ID_20	LIDVFDGPPPLYDDVQVQFFYSNLPTYYDNCSFYFWLATSFTIENRRLYLPKNELDNLRQK	504
SEQ_ID_21	LIDVFDGPPPLYDDVQVQFFYSNLPTYYDNCSFYFWLATSFTIENRRLYLPKNELDNLRQK	540
SEQ_ID_58	-----	-----
SEQ_ID_59	LIDVFDGPPPLYDDVQVQFFYSNLPTYYDNCSFYFWLATSFTIENRRLYLPKNELDNLRQK	435
SEQ_ID_60	LIDVFDGPPPLYDDVQVQFFYSNLPTYYDNCSFYFWLATSFTIENRRLYLPKNELDNLRQK	461
SEQ_ID_61	LIDVFDGPPPLYDDVQVQFFYSNLPTYYDNCSFYFWLATSFTIENRRLYLPKNELDNLRQK	421
SEQ_ID_19	ARRIYPSDFAVEILFGERMTSSDVVAGSD	551
SEQ_ID_20	ARRIYPSDFAVEILFGERMTSSDVVAGSD	533
SEQ_ID_21	ARRIYPSDFAVEILFGERMTSSDVVAGSD	569
SEQ_ID_58	-----	-----
SEQ_ID_59	ARRIYPSDFAVEILFGERMTSSDVVAGSD	468
SEQ_ID_60	ARRIYPSDFAVEILFGERMTSSDVVAGSD	470
SEQ_ID_61	ARRIYPSDFAVEILFGERMTSSDVVAGSD	450

Figura 3

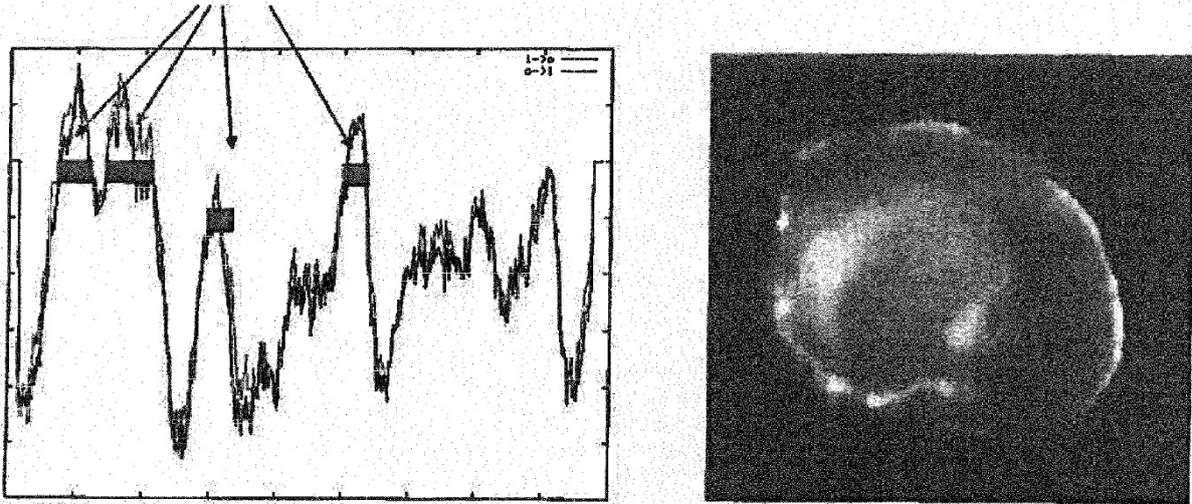


Fig. 4