

103
706

CAVELIER
ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Superintendencia de Industria y Comercio
Radicación: 0000397 0000001
Folios: 210
Fecha (V.O.): 2000-07-24 17:13:15
Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 325 COMPLETADO
Dependencia: EDO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señora Jefe de la
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

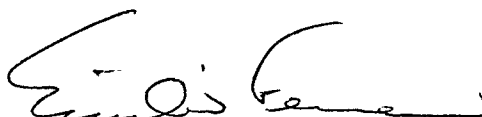
TRAMITE : 02 - EVENTO : 01 - ACTUACIÓN : 329

Referencia : Expediente No. 00.030.397
Solicitante : BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH
Asunto : Solicitud de patente para : ANTIGENO
ASOCIADO CON TUMORES
Fecha de solicitud : 27 de Abril de 2000

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado de la solicitud en referencia, atentamente, presento con este escrito copia certificada de la solicitud de patente alemana número 199 19 225.1 del 28 de Abril de 1999 junto con su respectiva traducción de su descripción, reivindicaciones y certificaciones, de la cual se reclama prioridad en esta solicitud de patente.

2. Ruego a la señora Jefe se sirva aceptar este escrito con sus anexos, y se continúe con el trámite de la solicitud.

Bogotá, 24 JUL. 2000
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929



Bescheinigung

Die Boehringer Ingelheim International GmbH in Ingelheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Tumorassoziertes Antigen"

am 28. April 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol A 61 K 39/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 12. April 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Agurks', written over the text 'Im Auftrag'.

Äktenzeichen: 199 19 225.1

Agurks

5 Case 12/203 DI Fa/dc

10

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

55216 Ingelheim am Rhein (D)

15

Titel: Tumorassoziertes Antigen

Die Erfindung bezieht sich auf die Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

5 Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen zu schützen bzw. diese aktiv zu bekämpfen. Die Bedeutung eines intakten Immunsystems zeigt sich vor allem bei vererbten oder erworbenen Immundefizienzen. Der Einsatz
10 von prophylaktischen Vakzinprogrammen erwies sich in vielen Fällen als äußerst zielführende und erfolgreiche immunologische Intervention im Kampf gegen virale oder bakterielle Infektionserkrankungen. Weiters hat sich gezeigt, daß das Immunsystem auch an der Eliminierung
15 von Tumorzellen maßgeblich beteiligt ist. Dabei spielt die Erkennung der tumorassoziierten Antigene (TAAs) durch Komponenten des Immunsystems eine wesentliche Rolle. Im weitesten Sinn kann jede (peptidische oder nicht peptidische) Komponente einer Tumorzelle, die von
20 einem Element des Immunsystems erkannt und zur Stimulation einer immunologischen Antwort führt, als immunogenes Tumorantigen fungieren. Besondere Bedeutung kommt dabei jenen Tumorantigenen zu, die nicht nur eine immunologische Reaktion hervorrufen, sondern auch eine
25 Abstoßung des Tumors bewirken. Die Identifizierung definierter Antigene, die solch eine immunologische Reaktion bewirken können, stellt einen wichtigen Schritt für die Entwicklung einer molekular definierten Tumervakzine dar. Obwohl noch nicht ganz geklärt ist,
30 welche Elemente des Immunsystems für eine Abstoßung des

Tumors verantwortlich sind, besteht doch ein Konsens darüber, daß dabei CD8-exprimierende zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) eine Hauptrolle spielen (Coulie, 1997). Besonders bei jenen Tumorarten (z.B. Melanom und Nierenkarzinom), die eine relativ hohe Spontanremissionsrate aufweisen, konnte eine Korrelation zwischen klinischem Verlauf und dem vermehrten Auftreten von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen festgestellt werden (Schendel et al., 1993; Mackensen et al., 1993; Halliday et al., 1995; Kawakami et al., 1995; Kawakami et al., 1996; Wang, 1997; Celluzzi und Fallo, 1998). Dabei wurden spezifische CTL-Klone entweder aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) oder peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) nach Kokultivierung mit meist autologen Tumorzellen und Zytokinstimulierung *in vitro* erhalten. Sowohl in Tiermodellen als auch in *in vitro* kultivierten humanen Zellkultursystemen konnte die T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen durch Transfektion der Tumorzellen mit Zytokinen verstärkt werden (van Elsas et al., 1997; Gansbacher et al., 1990; Tepper et al., 1989; Fearon et al., 1990; Dranoff et al., 1993).

Aufgrund der Korrelation zwischen Remission und Beteiligung von CD8⁺-T-Zellen ist die Identifizierung tumorassoziierter Antigene (TAA), die durch CD8-positive CTLs erkannt werden, ein erklärtes Hauptziel auf dem Weg zur Entwicklung einer Tumorstoffimpfung (Pardoll, 1998; Robbins und Kawakami, 1996). Ob auch andere Zelltypen des Immunsystems wie z.B. CD4⁺-T-Helferzellen eine wesentliche Rolle spielen ist noch unklar; einige Studien mit MAGE-3/HLA-A1 Peptiden in Melanompatienten deuten darauf hin

AAA

(Marchand et al., 1995; Boon et al., 1998). In den vergangenen Jahren ist eine Reihe von TAAs, die durch CTLs erkannt werden, identifiziert worden (Boon et al., 1994; van den Eynde und van der Bruggen, 1997).

- 5 T-Zellen erkennen Antigene als Peptidfragmente, die an Zelloberflächen von MHC-Molekülen („major histocompatibility complex“, im Menschen „HLA“ = „human leukocyte antigen“) präsentiert werden. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-I Moleküle kommen auf
- 10 den meisten Zellen mit Kern vor und präsentieren Peptide (üblicherweise 8-10-mere), die durch proteolytischen Abbau endogener Proteine entstehen (sog. Antigen-Verarbeitung, „antigen processing“). Peptid:MHC-I Komplexe werden von CD8-positiven CTLs
- 15 erkannt. MHC-II Moleküle kommen nur auf sog. „professionellen antigen-präsentierenden Zellen“ (APC) vor, und präsentieren Peptide exogener Proteine, die im Zuge der Endocytose von APC aufgenommen und verarbeitet werden. Peptid:MHC-II Komplexe werden von CD4-Helfer-T-
- 20 Zellen erkannt. Durch eine Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Peptid:MHC Komplex können verschiedene Effektormechanismen ausgelöst werden, die im Fall von CTLs zur Apoptose der Zielzelle führen. Das geschieht, wenn entweder der MHC (z.B. im Fall der
- 25 Transplantatabstoßung), oder das Peptid (z.B. im Fall intrazellulärer Pathogene) als fremd erkannt wird. Allerdings erfüllen nicht alle präsentierten Peptide die strukturellen und funktionellen Anforderungen für eine effektive Interaktion mit T-Zellen (wie von
- 30 Rammensee et al., 1995 und weiter unten beschrieben).

AAZ

Für den Einsatz von TAAs in einer Tumorstoffvakzine sind grundsätzlich mehrere Applikationsformen möglich: Das Antigen kann entweder als rekombinantes Protein mit geeigneten Adjuvantien bzw. Trägersystemen, oder als
5 für das Antigen kodierende cDNA in Plasmid- (DNA-Vakzine; Tighe et al., 1998), bzw. viralen Vektoren (Restifo, 1997) appliziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von rekombinanten Bakterien (z.B. Listeria, Salmonella), die das humane
10 Antigen rekombinant exprimieren und durch ihre zusätzlichen Komponenten eine adjuvative Wirkung haben (Paterson, 1996; Pardoll, 1998). In allen diesen Fällen ist eine Verarbeitung und Präsentation des Antigens durch sog. „professionelle antigen-präsentierende
15 Zellen“ (APC) notwendig. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz synthetischer Peptide (Melief et al., 1996), die den korrespondierenden T-Zell-Epitopen des Antigens entsprechen und die entweder von außen auf die APC geladen (Buschle et al., 1997; Schmidt et al.,
20 1997) oder von den APC aufgenommen und intrazellulär auf die MHC I Moleküle transferiert werden. Die therapeutisch effizienteste Applikationsform für ein definiertes Antigen wird im allgemeinen in klinischen Studien bestimmt.

25 Zu den von den tumorspezifischen CTLs erkannten Antigenen bzw. deren Epitopen zählen Moleküle, die aus sämtlichen Proteinklassen stammen können (z.B. Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Enzyme; zur Übersicht siehe Rammensee et al., 1995; Robbins und
30 Kawakami, 1996). Diese Proteine müssen nicht notwendigerweise an der Zelloberfläche lokalisiert sein, wie dies bei der Erkennung durch Antikörper

443

erforderlich ist. Um für die Erkennung durch CTLs als tumorspezifisches Antigen zu fungieren bzw. um für die Therapie eingesetzt zu werden, müssen die Proteine bestimmte Bedingungen erfüllen: erstens soll das

5 Antigen hauptsächlich von Tumorzellen exprimiert werden und in sog. "kritischen" Normalgeweben nicht oder nur in geringerer Konzentration als in Tumoren vorkommen. Kritische Normalgewebe sind essentielle Gewebe; eine gegen sie gerichtete Immunreaktion könnte unter

10 Umständen schwerwiegende, zum Teil lethale Folgen haben. Zweitens soll das Antigen nicht nur im Primärtumor, sondern auch in den Metastasen vorhanden sein. Des weiteren ist es im Hinblick auf eine breite klinische Anwendung des Antigens erstrebenswert, wenn

15 es in mehreren Tumorarten in hoher Konzentration vorhanden ist. Eine weitere Vorbedingung für die Eignung eines TAA als wirksamer Bestandteil einer Vakzine ist das Vorhandensein von T-Zell-Epitopen in der Aminosäuresequenz des Antigens; vom TAA abgeleitete

20 Peptide sollen zu einer *in vitro/in vivo* T-Zell Antwort führen ("immunogenes" Peptid). Ein weiteres Selektionskriterium für ein klinisch breit anwendbares immunogenes Peptid ist die Häufigkeit, mit der das Antigen in einer gegebenen Patientenpopulation

25 anzutreffen ist.

Die immunogenen tumorassoziierten Antigene (TAAs), von denen größtenteils bereits gezeigt wurde, daß sie T-Zell Epitope besitzen, lassen sich in mehrere Kategorien einteilen, u.a. virale Proteine, mutierte

30 Proteine, überexprimierte Proteine, durch chromosomale Translokation gebildete Fusionsproteine, Differenzierungsantigene, onkofötale Antigene (Van den

114

Eynde und Brichard, 1995; van den Eynde und van der Bruggen, 1997).

Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von TAAs, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Tumorstoffe darstellen, beruhen einerseits auf dem Einsatz von in Patienten bereits induzierten CTLs (zelluläre Immunantwort) oder Antikörpern (humorale Immunantwort), oder basieren auf der Erstellung differenzieller Transkriptionsprofile zwischen Tumoren und Normalgeweben. Im ersten Fall, dem immunologischen Ansatz, werden Patienten-CTLs für ein Screening eukaryotischer Tumor-cDNA-Expressionsbibliotheken, die über MHC-I Moleküle die CTL-Epitope präsentieren, eingesetzt (Boon et al., 1994), während mittels hochaffiner Patienten-Antisera prokaryotische-cDNA-Expressionsbibliotheken, direkt über eine Immunoblot-Analyse der einzelnen Plaques auf das Vorhandensein von TAAs untersucht werden (Sahin et al., 1995). Eine Kombination von CTL-Reaktivität und proteinchemischen Verfahren stellt die Isolierung von aus MHC-I isolierten Peptiden von Tumorzellen dar, die über Reaktivität mit Patienten-CTLs vorselektioniert wurden. Die Peptide werden aus dem MHC-I Komplex ausgewaschen und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert (Falk et al., 1991; Woelfel et al., 1994; Cox et al., 1994). Die Ansätze, welche CTLs zum Charakterisieren von Antigenen verwenden, sind aufgrund der erforderlichen Kultivierung und Aktivierung von CTLs mit einem erheblichen Aufwand verbunden bzw. nicht immer erfolgreich.

AKS

Methoden zur Identifizierung von TAAs, welche auf dem Vergleich des Transkriptionsprofils von Normal- mit Tumorgewebe beruhen, sind vielfältig; dazu zählen die differenzielle Hybridisierung, die Erstellung von

5 Subtraktions-cDNA-Banken ("representational difference analysis"; Hubank und Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) und der Einsatz der DNA-Chip Technologie oder der SAGE-Methode (Velculescu et al., 1995). Im Gegensatz zur oben erwähnten immunologischen Methode mit Hilfe

10 von Patienten-CTLs muß beim Einsatz von molekularbiologischen Methoden gezeigt werden, daß die damit gefundenen potentiellen Antigenkandidaten tumorspezifisch (tumorassoziiert) sind und tatsächlich T-Zell Epitope besitzen, die eine zytotoxische T-Zell

15 Antwort auslösen können. In zumindest einem Fall (NY-ESO/LAGE-1) wurde ein Antigen sowohl durch die Verwendung von Patientenseren als auch durch RDA identifiziert (Chen et al., 1997; Lethe et al. 1998), außerdem wurden CTL-Epitope dieses Antigens und eine

20 gleichzeitige spontane humorale und T-Zell Antwort in einem Patienten beschrieben (Jager et al., 1998).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein neues tumorassoziiertes Antigen (TAA) bereitzustellen.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA

25 („representational difference analysis“) zwischen einer Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie (A549) und Normallungengewebe eine cDNA-Subtraktionsbibliothek hergestellt wurde. Zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene wurden anschließend die

30 erhaltenen cDNA-Klone sequenziert und mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen verglichen. Unter den

AAG

dabei annotierten Genen befanden sich 321 unbekannte, zu denen größtenteils ESTs („expressed sequence tags“)-Einträge in der Datenbank existierten. Nach einer weiteren qualitativen PCR-Analyse in cDNA-Bibliotheken von kritischen Normalgeweben und immunprivilegierten Geweben sowie detaillierteren Datenbankrecherchen wurden die Anzahl der Kandidatenklone auf 56 eingeschränkt, deren ESTs nicht aus kritischen Normalgeweben stammen. Mittels RT-PCR wurde festgelegt, daß drei der 56 untersuchten Klone eine Expression hauptsächlich in verschiedenen Tumorgeweben und keine oder geringe Expression in Normalgeweben aufweisen. Der qualitative Vergleich (mittels PCR) der Expression eines der Klone (B99) zwischen Tumor- und Normalgewebe zeigte eine Überexpression der B99-cDNA in verschiedenen Tumoren. Das mittels Northern Blot analysierte Expressionsprofil zeigte ergänzend, daß B99 in den untersuchten Normalgeweben keine oder nur eine schwache Transkription aufwies.

Die humane B99-cDNA wurde kloniert, die erhaltene Sequenz ist in SEQ ID NO:1 dargestellt. Die Sequenzanalyse der klonierten humanen B99-cDNA ergab, daß von Position 427 bis Position 1743 ein durchgehender offener Leserahmen vorliegt, der, auf Nukleotid- und Proteinebene, eine hohe Identität mit dem offenen Leserahmen von beta-1,3-Galaktosyl-o-Glykosyl-Glykoprotein beta-1,6-n-Azetyglucosaminyltransferase besitzt. Aus den aus Northern Blot Experimenten gewonnenen Daten ist zu schließen, daß das B99-Transkript eine Länge von ca. 3,0 kb hat. Der klonierte Bereich der B99-cDNA beträgt 2216 bp, wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes

114
447

am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA in diesem Bereich spricht. Der Unterschied in der Größe der klonierten B99-cDNA im Vergleich zu der aus der Northern Blot Analyse ableitbaren Größe läßt sich durch
5 das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes unbekannter Länge sowie eine zusätzliche Sequenz im 5'-nicht translatierten Bereich von B99 erklären. Aufgrund der Tatsache, daß im 5'-Bereich der klonierten cDNA von Position 0 bis 427 kein durchgehender Leserahmen
10 vorhanden ist, kann gefolgert werden, daß es sich bei dem ATG an Position 427 um das Startkodon von B99 handelt.

Zusätzliche Information über die weiter stromaufwärts liegende Sequenz von B99 kann durch
15 molekularbiologische Standardmethoden gewonnen werden, z.B. mittels 5'-RACE („rapid amplification of cDNA ends“). Bei dieser Methode wird RNA, vorzugsweise mRNA, aus Zellen oder Geweben, in denen B99 transkribiert wird (z.B. Kolonkarzinom-Gewebe oder von
20 Lungenadenokarzinom abgeleitete Zelllinien wie A549) revers transkribiert und anschließend mit einem Adaptor bekannter Sequenz ligiert. Eine PCR mit einem Adaptorprimer (bindet spezifisch an den Adaptor am 5'-Ende der cDNA) und einem B99-spezifischen Primer (z.B.
25 SEQ ID NO:8, 10, 11) erlaubt die Amplifikation entsprechender B99-Fragmente. Diese PCR-Produkte können, wie in Beispiel 1 beschrieben, nach Standardmethoden kloniert und, insbesondere durch DNA Sequenzierung, charakterisiert werden.

30 Eine alternative Methode zur Charakterisierung des 5'-Endes ist das Screenen von cDNA-Bibliotheken durch

A18

Hybridisierung mit für B99 spezifischen DNA-Sonden oder Antiseren.

Führt das Screenen von cDNA-Bibliotheken aufgrund methodisch bedingter Beschränkungen, z.B. ineffiziente
5 reverse Transkription bedingt durch ausgeprägte Sekundärstrukturen der RNA, nicht zum gewünschten Ziel, können genomische Bibliotheken untersucht werden, indem z.B., wie beim Screenen von cDNA-Bibliotheken, durch Hybridisierung mit für B99 spezifischen DNA-Sonden
10 Klone isoliert werden können, die die stromaufwärts vom erhaltenen 5'-Ende der cDNA liegende Sequenzinformation z.B. die Promotorregion von B99 enthalten.

Die isolierte cDNA kodiert für das tumorassoziierte Antigen (TAA) der Bezeichnung B99 mit der in SEQ ID
15 NO:2 angegebenen Aminosäuresequenz (B99-1). Die Sequenz von B99-1 wird definiert durch das Startcodon an Position 427 der isolierten B99-cDNA.

In einem weiteren Versuch zur Klonierung des kodierenden Bereichs von B99, bei dem cDNA aus der
20 Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 verwendet wurde, wurde eine Sequenz ermittelt, die im Vergleich zur in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz eine Insertion eines Nukleotids an Position 923 aufweist (SEQ ID NO:3 bzw. SEQ ID NO:5). Diese Insertion führt zu einer
25 Veränderung des offenen Leserahmens von B99 mit einer daraus resultierenden veränderten Aminosäuresequenz im C-terminalen-Bereich des B99-Proteins; die von diesem Leserahmen abgeleitete Sequenz dieses B99-Antigens (B99-2) ist in SEQ ID NO:4 dargestellt. Außer der
30 Insertion weist die aus A549-Zellen isolierte cDNA

einen Nukleotidaustausch an Position 622 im Vergleich zu Sequenz SEQ ID NO:1 auf. Dieser Nukleotidaustausch bedingt an Position Nr. 66 einen Ersatz von Arginin (SEQ ID NO:2, B99-1) durch Tryptophan (SEQ ID NO:4, B99-2). Abgesehen von diesem Aminosäureaustausch ist die Aminosäuresequenz von B99-2 bis einschließlich Position 166 identisch mit B99-1.

Die Insertion eines Nukleotids an Position 923 ergibt einen zweiten potentiellen Leserahmen von Pos. 845 bis 1744 der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz. Ein von einer cDNA mit diesem Leserahmen exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:6 dargestellte Aminosäuresequenz auf (B99-3). Die Sequenz von B99-3 ist von Pos. 1 bis 27 unterschiedlich zu B99-1 und ab Pos 28 identisch mit B99-1.

Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein tumorassoziertes Antigen der Bezeichnung B99, ausgewählt aus der Gruppe von Polypeptiden mit der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 angegebenen Aminosäuresequenz.

Die in SEQ ID NO:2 (B99-1), SEQ ID NO:4 (B99-2) und SEQ ID NO:6 (B99-3) dargestellten Aminosäuresequenzen können Abweichungen aufweisen, z.B. solche, die durch Austausch von Aminosäuren bedingt sind, sofern das B99-Derivat die für die Anwendung in einer Tumorstoffimpfung erwünschten immunogenen Eigenschaften aufweist. (Ein Beispiel für einen B-99-Polymorphismus dieser Art ist der durch die Punktmutation bedingte Unterschied an Position 66 zwischen B99-1 und B99-2).

Im folgenden wird, wenn nicht anders angegeben, die Bezeichnung „B99“ stellvertretend für B99-1, B99-2 und B99-3 verwendet.

Die natürliche Aminosäuresequenz von B99 (bzw.
5 entsprechend die Sequenzen der B99-cDNA) kann gegebenenfalls modifiziert sein, indem einzelne Aminosäuren in einem B99 CTL-Epitop ausgetauscht werden, um, im Vergleich zum natürlichen B99 CTL-Epitop, eine Steigerung der Affinität von B99-Peptiden
10 zu MHC-I-Molekülen und damit eine erhöhte Immunogenität und letztlich eine verstärkte Reaktivität gegenüber Tumoren zu bewirken. Modifikationen im Bereich der B99-Epitope können am B99-Gesamtprotein (dieses wird von den APCs zu den entsprechenden Peptiden prozessiert)
15 bzw. an größeren B99-Proteinfragmenten oder an B99-Peptiden (vgl. unten) vorgenommen werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung immunogene Fragmente und Peptide, die von B99 abgeleitet sind. Letztere werden im folgenden als
20 "B99-Peptide" bezeichnet. Eine erste Gruppe sind B99-Peptide, die eine humorale Immunantwort (Induktion von Antikörpern) auslösen. Derartige Peptide sind ausgewählte Abschnitte von B99 (mindestens 12 bis 15 Aminosäuren), die mittels sogenannter Vorhersage-
25 Algorithmen ("prediction algorithms") wie z.B. dem "surface probability blot" (Emini et al., 1985), dem "hydrophobicity blot" (Kyte and Doolittle, 1982) und dem "antigenic index" (Jameson and Wolf, 1988) ermittelt werden können.

421

Bei der Auswahl von B99-Peptidkandidaten verdienen die Regionen von B99-2 und B99-3, die sich von B99-1 unterscheiden, besonderes Interesse. Unter der Voraussetzung, daß es sich bei der Insertion der B99-DNA, die zu diesen Unterschieden in der Aminosäuresequenz führt, um eine tumorspezifische Mutation handelt, ist nämlich zu erwarten, daß Peptide aus diesem Bereich eine verstärkte Immunogenität im Vergleich zu Peptiden aus B99-1 aufweisen. Um zu bestätigen, daß die Insertion tumorspezifisch ist, können Antikörper gegen diesen Bereich generiert und Tumorzellen auf Expression von B99-2 und B99-3 untersucht werden.

B99-Peptide werden direkt oder in modifizierter Form (z.B. an KLH = "keyhole limpet hemocyanine" gekoppelt) verabreicht und die Bildung von Antikörpern mittels gängiger immunologischer Assays, z.B. mittels ELISA, bestimmt.

Weitere, im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugte, B99-Peptide sind diejenigen, die durch MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort bewirken. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, nämlich MHC-I-Moleküle, die von CD8-positiven CTLs und MHC-II-Moleküle, die von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt werden.

Damit ein Peptid eine zelluläre Immunantwort auslöst, muß es an ein MHC-Molekül binden, wobei der zu behandelnde Patient das MHC-Molekül in seinem Repertoire aufweisen muß. Die Bestimmung des MHC-Subtyps des Patienten stellt somit, im Hinblick auf die Auslösung

H22

einer zellulären Immunantwort, eine der wesentlichen Voraussetzungen für die wirksame Anwendung eines Peptids an diesem Patienten dar.

Die Sequenz eines therapeutisch einzusetzenden B99-Peptids wird durch das jeweilige MHC-Molekül hinsichtlich Ankeraminosäuren und Länge vorgegeben. Definierte Ankerpositionen und Länge gewährleisten, daß ein Peptid in die Peptid-Bindungsfurche des jeweiligen MHC-Moleküls des Patienten paßt. Dies hat zur Folge, daß das Immunsystem stimuliert wird und eine zelluläre Immunreaktion erzeugt wird, die sich, im Falle der Verwendung eines von einem Tumorantigen abgeleiteten Peptids, gegen die Tumorzellen des Patienten richtet.

Immunogene B99-Peptide können nach bekannten Methoden identifiziert werden, eine der Grundlagen dafür ist die Beziehung zwischen MHC-Bindung und CTL-Induktion.

Da also die Sequenz immunogener Peptide aufgrund ihres Peptidbindungsmotivs vorherbestimmbar ist, können B99-Peptide, die CTL-Epitope darstellen, aufgrund der B99-Proteinsequenz identifiziert und synthetisiert werden. Dazu sind verschiedene Methoden geeignet, die zur Identifizierung von CTL-Epitopen von bekannten Protein-Antigenen verwendet wurden; z.B. die von Stauss et al., 1992, für die Identifizierung von T-Zell-Epitopen in humanem Papillomavirus beschriebene Methode.

Die allelspezifischen Anforderungen jedes MHC-I Allel-Produkts an ein Peptid, das an das MHC-Molekül bindet und von diesem präsentiert wird, wurden als Motiv zusammengefaßt (z.B. Falk et al., 1991). Bisher ist

eine große Anzahl sowohl von MHC-Peptid-Motiven als auch von MHC-Liganden bekannt. Eine im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Suche nach Epitopen eines bekannten Proteins, das in ein
5 bestimmtes MHC-I-Molekül paßt, wurde in einem Übersichtsartikel von Rammensee et al., 1995, beschrieben. Sie umfaßt die folgenden Schritte: zunächst wird die Protein-Sequenz auf Abschnitte untersucht, die dem Anker-Motiv entsprechen, wobei
10 gewisse Variationen hinsichtlich Peptidlänge und Ankerbesetzung möglich sind. Wenn z.B. ein Motiv ein 9-mer mit Ile oder Leu am Ende vorschreibt, können auch 10-mere mit einem entsprechenden C-Terminus in Betracht gezogen werden, ebenso Peptide mit anderen
15 aliphatischen Resten, wie Val oder Met am C-Terminus. Auf diese Weise wird eine Reihe von Peptid-Kandidaten erhalten. Diese werden auf das Vorhandensein möglichst vieler Ankerreste, die sie gemeinsam mit bereits bekannten Liganden haben, untersucht und/oder
20 daraufhin, ob sie für verschiedene MHC-Moleküle "bevorzugte" Reste haben (entsprechend der Tabelle von Rammensee et al., 1995). Um schwach bindende Peptide auszuschließen, werden zweckmäßig Bindungs-Assays durchgeführt. Wenn die Anforderungen an die Peptid-
25 Bindung für bestimmte MHC-Moleküle bekannt sind, können die Peptid-Kandidaten auch auf Nicht-Ankerreste untersucht werden, die sich negativ oder positiv auf die Bindung auswirken, oder die diese erst ermöglichen (Ruppert et al., 1993). Bei dieser Vorgangsweise ist
30 jedoch in Betracht zu ziehen, daß das Peptid-Bindungs-Motiv für die Suche nach natürlichen Liganden nicht allein ausschlaggebend ist; auch andere Aspekte, z.B.

124

die Enzymspezifität während der Antigenprozessierung, tragen - zusätzlich zur Spezifität der MHC-Bindung - zur Identität des Liganden bei. Eine Methode, die diese Aspekte berücksichtigt, und die im Rahmen der

5 vorliegenden Erfindung zur Identifizierung von immunogenen B99-Peptiden geeignet ist, wurde u.a. von Kawakami et al., 1995, angewendet, um auf der Grundlage bekannter HLA-A*0201 Motive gp100 Epitope zu identifizieren.

- 10 Die Peptide können auch im Hinblick auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-II-Moleküle ausgewählt werden. Das MHC-II-Bindungsmotiv, das sich über neun Aminosäuren erstreckt, weist einen höheren Grad an Degeneration in den Ankerpositionen auf als das MHC-I-
- 15 Bindungsmotiv. Es wurden kürzlich, ausgehend von der Röntgenstrukturanalyse von MHC-II-Molekülen, Methoden entwickelt, die die genaue Analyse der MHC-II-Bindungsmotive, und ausgehend davon, Variationen der Peptidsequenz erlauben (Rammensee et al., 1995, und die
- 20 dort zitierte Originalliteratur). Peptide, die an MHC-II-Moleküle binden, werden den CD4-T-Zellen typischerweise von dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen präsentiert. Die CD4-T-Zellen wiederum aktivieren dann in der Folge direkt CTLs durch z.B.
- 25 Cytokin-Ausschüttung und Verstärken die Effizienz der Antigen-Präsentation durch APC (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen).

Seit kurzem sind Datenbanken und Vorhersage-Algorithmen verfügbar, die mit großer Verlässlichkeit die Vorhersage

30 von Peptid-Epitopen erlauben, die an ein bestimmtes MHC-Molekül binden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden, unter Verwendung des von Parker et al., 1994 und Rammensee et al., 1995 beschriebenen Algorithmus, für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1, 5 -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tabelle 2 aufgelistet. Auf ähnliche 10 Weise können, gegebenenfalls unter Verwendung weiterer Algorithmen, die den unterschiedlichen Charakteristika der Peptide (Hydrophobizität, Ladung, Größe) bzw. Anforderungen an die Peptide, z.B. die 3D-Struktur des HLA-Moleküls, Rechnung tragen, weitere potentielle 15 Peptid-Epitope ermittelt werden; dies gilt auch für Peptid-Epitope anderer HLA-Typen.

Nach Auswahl von B99-Peptid-Kandidaten mit Hilfe der angeführten Methoden wird deren MHC-Bindung mittels Peptidbindungs-Assays getestet. Als nächstes wird die 20 Immunogenität der Peptide mit guten Bindungseigenschaften bestimmt (Stabilität der Peptid-MHC-Wechselwirkung korreliert in den meisten Fällen mit Immunogenität; van der Burg et al., 1996). Um die Immunogenität des ausgewählten Peptids oder Peptid- 25 Äquivalents zu bestimmen, können Methoden, wie z.B. von Sette et al., 1994, beschrieben, in Kombination mit quantitativen MHC-Bindungs-Assays verwendet werden. Alternativ kann die Immunogenität des ausgewählten Peptids über *in vitro* CTL-Induktion mittels bekannter 30 Methoden (wie weiter unten für *ex vivo* CTL-Induktion beschrieben) getestet werden. Das Prinzip der in mehreren Schritten durchgeführten Methode für die

Auswahl von Peptiden, die zur Auslösung einer zellulären Immunantwort fähig sind, ist in der WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, beschrieben. Eine allgemeine
5 Strategie zum Erhalt effizienter immunogener Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wurde außerdem von Schweighoffer, 1997, beschrieben.

Statt die Originalpeptide zu verwenden, die in die Bindungsfurche von MHC-I -oder MHC-II-Molekülen passen,
10 also Peptide, die unverändert von B99 abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge Variationen vorgenommen werden, sofern durch diese Variationen die
15 effektive Immunogenität des Peptids, die sich zusammensetzt aus seiner Bindungsaffinität an das MHC-Molekül und seiner Fähigkeit, T-Zell-Rezeptoren zu stimulieren, nicht nur nicht beeinträchtigt ist, sondern vorzugsweise verstärkt wird. In diesem Fall
20 werden also künstliche Peptide oder Peptid-Äquivalente verwendet, die entsprechend den Anforderungen der Bindungsfähigkeit an ein MHC-Molekül entworfen sind.

Solchermaßen veränderte Peptide werden als „heteroclitische Peptide“ bezeichnet. Sie können nach
25 folgenden Methoden erhalten werden:

Zunächst werden die Epitope von MHC-I- bzw. MHC-II-Liganden bzw. deren Variation z.B. nach dem von Rammensee et al., 1995, beschriebenen Prinzip vorgenommen. Die Länge des Peptids entspricht im Falle
30 seiner Abstimmung auf MHC-I Moleküle vorzugsweise einer

Minimalsequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeraminosäuren.

Gegebenenfalls kann das Peptid auch am C- und/oder am N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung
5 die Bindungsfähigkeit an das MHC-Molekül nicht beeinträchtigt bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalsequenz zellulär prozessiert werden kann.

Die modifizierten Peptide werden daraufhin auf ihre Erkennung durch TILs („tumor-infiltrating
10 lymphocytes“), auf CTL-Induktion sowie auf verstärkte MHC-Bindung und Immunogenität geprüft, wie von Parkhurst et al., 1996, und Becker et al., 1997, beschrieben.

Eine weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung
15 geeignete Methode zur Auffindung von Peptiden mit stärkerer Immunogenität als die der natürlichen B99-Peptide besteht im Screenen von Peptid-Bibliotheken mit CTLs, die die natürlich auf Tumoren vorkommenden B99-Peptide erkennen, wie von Blake et al., 1996,
20 beschrieben; in diesem Zusammenhang wird die Verwendung kombinatorischer Peptid-Bibliotheken vorgeschlagen, um Moleküle zu entwerfen, welche von MHC-I-restringierten CTLs erkannte Tumorepitope nachahmen.

Die B99-Polypeptide der vorliegenden Erfindung oder
25 davon abgeleitete immunogene Fragmente oder Peptide können rekombinant oder mittels Peptid-Synthese hergestellt werden, wie in der WO 96/10413 beschrieben, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Für die rekombinante Herstellung wird das entsprechende
30 DNA-Molekül nach Standardmethoden in einen

128

Expressionsvektor eingefügt, in eine geeignete Wirtszelle transfiziert, der Wirt unter geeigneten Expressionsbedingungen kultiviert und das Protein gereinigt. Für die chemische Synthese von B99-Peptiden
5 können herkömmliche Methoden verwendet werden, z.B. im Handel erhältliche automatische Peptid-Synthesizer.

Alternativ zu natürlichen B99-Peptiden oder heteroclitischen Peptiden können Substanzen, die solche Peptide vortäuschen, z.B. "Peptidomimetica" oder "retro-
10 inverse-Peptide", verwendet werden. Zur Testung dieser Moleküle im Hinblick auf die therapeutische Verwendbarkeit in einer Tumorstoffimpfung werden dieselben Methoden angewendet wie oben für die natürlichen B99-Peptide oder B99-Peptidäquivalente.

15 Das TAA der Bezeichnung B99 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z.B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die
20 die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von B99-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Nierenzell-, Lungen-, Kolon-, Pankreas- und Magenkarzinom.

25 Die Immunantwort in Form einer Induktion von CTLs kann *in vivo* oder *ex vivo* bewirkt werden.

Für die *in vivo* Induktion von CTLs wird eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als wirksame Komponente das TAA B99 bzw. davon abgeleitete Fragmente
30 oder Peptid(e), einem Patienten verabreicht, der an

129

einer mit dem TAA assoziierten Tumorerkrankung leidet, wobei die Menge an TAA(Peptid) ausreichen muß, um eine wirksame CTL-Antwort auf den Antigen-tragenden Tumor zu erzielen.

- 5 Die Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung. Vorzugsweise dient die Zusammensetzung der parenteralen Verabreichung, z.B. für die subkutane, intradermale oder
- 10 intramuskuläre Anwendung. Die B99-TAAs/Peptide sind in einem pharmazeutisch annehmbaren, vorzugsweise wässerigen, Träger gelöst oder suspendiert. Die Zusammensetzung kann außerdem übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, etc. enthalten. Die TAAs/Peptide können allein
- 15 oder in Kombination mit Adjuvantien, z.B. inkomplettem Freund's Adjuvans, Saponinen, Aluminiumsalzen oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, Polykationen wie Polyarginin oder Polylysin, verwendet werden. Die Peptide können auch an Komponenten, die die
- 20 CTL-Induktion oder CTL-Aktivierung unterstützen, gebunden werden, z.B. an T-Helferpeptide, Lipide oder Liposomen, oder sie werden gemeinsam mit diesen Substanzen und/oder gemeinsam mit immunstimulierenden Substanzen, z.B. Zytokinen (IL-2, IFN- γ) verabreicht.
- 25 Methoden und Formulierungen, die zur Herstellung und Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet sind, sind in der WO 95/04542 und WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird, beschrieben.
- 30 B99(Fragmente) bzw. B99-Peptide können auch verwendet werden, um eine CTL-Antwort ex vivo auszulösen. Eine ex

vivo CTL-Antwort auf einen Tumor, der B99 exprimiert, wird induziert, indem man die CTL-Vorläuferzellen zusammen mit APCs und B99-Peptiden bzw B99-Protein inkubiert. Dann läßt man die aktivierten CTLs expandieren, worauf sie dem Patienten wieder verabreicht werden. Alternativ können APCs mit B99-Peptiden beladen werden, was zu einer effizienten Aktivierung zellulärer Immunreaktionen gegen B99 positive Tumoren führen kann (Mayordomo et al., 1995; Zitvogel et al., 1996). Eine geeignete Methode um Peptide auf Zellen, z.B. dendritische Zellen, zu laden, wird in der WO 97/19169 geoffenbart.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination mehrerer verschiedener B99-Peptide oder B99-Peptidäquivalente angewendet. In einer weiteren Ausführungsform werden B99-Peptide mit von anderen TAAs abgeleiteten Peptiden kombiniert. Die Auswahl von Peptiden für derartige Kombinationen wird im Hinblick auf die Erfassung unterschiedlicher MHC-Typen getroffen, um eine möglichst breite Patientenpopulation abzudecken, und/oder sie wird auf ein möglichst breites Indikationsspektrum abgestellt, indem Peptide mehrerer unterschiedlicher Tumorantigene kombiniert werden. Die Anzahl der Peptide in einer pharmazeutischen Zusammensetzung kann über einen weiten Bereich schwanken, typischerweise enthält eine klinisch anwendbare Vakzine 1 bis 15, vorzugsweise 3 bis 10 verschiedene Peptide.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch als diagnostische Reagentien eingesetzt werden. Beispielsweise können die Peptide dazu benutzt werden,

B1

um das Ansprechen eines Patienten auf die durch das immunogene Peptid hervorgerufene humorale oder zelluläre Immunantwort zu testen. Dadurch besteht die Möglichkeit, ein Behandlungsprotokoll zu verbessern. Beispielsweise
5 kann in Abhängigkeit der Darreichungsform (Peptid, Gesamtprotein oder DNA-Vakzine) des TAA die Zunahme von Vorläufer T-Zellen in den PBLs, die eine Reaktivität gegen das definierte Peptidepitop aufweisen, untersucht werden (Robbins und Kawakami, 1996 sowie darin zitierte
10 Referenzen). Außerdem können die Peptide oder das Gesamtprotein bzw. gegen das TAA gerichtete Antikörper dazu verwendet werden, um das Risiko eines Patienten an einem B99-assoziierten Tumor zu erkranken, vorherzusagen bzw. den Krankheitsverlauf eines B99-positiven Tumors zu
15 charakterisieren (z.B. durch immunhistochemische Analysen von Primärtumor und Metastasen). Eine derartige Strategie hat sich schon mehrfach als erfolgreich erwiesen, z.B. der Nachweis des Östrogenrezeptors als Entscheidungsgrundlage zur Endokrintherapie bei
20 Brustkrebs; c-erbB-2 als relevanter Marker bei Prognostik und Therapieverlauf bei Brustkrebs (Ravaioli et al., 1998; Revillion et al., 1998); PSMA ("prostate specific membrane antigen") als Marker für Epithelialzellen des Prostatakarzinoms im Serum bzw.
25 durch Einsatz eines ¹¹¹In-markierten monoklonalen Antikörpers gegen PSMA bei der Immunoscintigraphie auf Prostatakarzinom (Murphy et al., 1998 und inkludierte Referenzen); CEA ("carcinoembryonic antigen") als serologischer Marker für die Prognose und Verlauf bei
30 Patienten des kolorektalen Karzinoms (Jessup und Loda, 1998).

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt isolierte DNA-Moleküle, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften von B99 oder für Fragmente davon.

- 5 In einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, das ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz enthält oder das ein Polynukleotid enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz unter
10 stringenten Bedingungen hybridisiert.

- In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, das ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz enthält oder das ein
15 Polynukleotid enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

- Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle bzw. Fragmente davon kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung B99 (B99-1, B99-2 oder B99-3) mit der in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6 dargestellten Aminosäuresequenz bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind DNA Moleküle mitumfaßt, die durch die Degeneration des genetischen Codes Abweichungen von der
20 in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 bzw. SEQ ID NO:5 dargestellten Sequenz aufweisen.

- Die Erfindung betrifft auch DNA-Moleküle, die durch konservativen Austausch von Aminosäuren bedingte Abweichungen von der in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3
30 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz aufweisen,

133

sofern sie für ein B99-Derivat bzw. Fragmente oder Peptide mit den für die Anwendung als Tumorstoffe erwünschten immunogenen Eigenschaften kodieren.

Im folgenden werden die oben definierten,
5 gegebenenfalls modifizierten, für B99-1, B99-2 bzw. B99-3 bzw. für Fragmente davon kodierenden DNA-Moleküle, wenn nicht anderes angegeben, als „B99-DNA-Moleküle“ bezeichnet.

Die B99-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung oder
10 die entsprechenden RNAs, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, werden, wie die davon kodierten (Poly)Peptide, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen eingesetzt.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden
15 DNA-Moleküle, kodierend für natürliche B99-Polypeptide verwendet. Alternativ zur natürlichen B99-cDNA bzw. Fragmenten davon können modifizierte Derivate verwendet werden. Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen, die für ein Protein(fragment) bzw. Peptide mit
20 stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen gelten wie für die oben beschriebenen Peptide. Eine weitere Art der Modifikation ist die Aneinanderreihung zahlreicher Sequenzen, kodierend für immunologisch
25 relevante Peptide, nach Art einer Perlenschnur („string-of-beads“; Toes et al., 1997). Die Sequenzen können auch durch Anfügung von Hilfselementen modifiziert werden, z.B. Funktionen, die eine effizientere Abgabe und Prozessierung des Immunogens
30 gewährleisten (Wu et al., 1995). Beispielsweise kann

136

können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf herkömmliche Weise chimerisiert (Neuberger et al., 1984, Boulianne et al., 1984) oder humanisiert (Riechmann et al., 1988, Graziano et al., 1995) werden.

- 5 Humane monoklonale anti-B99-Antikörper(fragmente) können auch von sog. „Phage Display Libraries“ (Winter et al., 1994, Griffiths et al., 1994, Kruif et al., 1995, Mc Guinness et al., 1996) und mittels transgener Tiere (Brüggemann et al., 1996, Jakobovits et al., 10 1995) gewonnen werden.

Die erfindungsgemäßen anti-B99-Antikörper können in immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

- In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die 15 Verwendung von B99-spezifischen Antikörpern, um beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu bringen, der B99 exprimiert. Beispiele für solche Substanzen sind zytotoxische Agentien oder radioaktive Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor vorort 20 zu schädigen. Aufgrund der tumorspezifischen Expression von B99 sind dabei keine oder nur geringe Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt können mit Hilfe von B99-Antikörpern Substanzen zur Sichtbarmachung von Tumoren, die B99 exprimieren, 25 herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen.
- Therapeutische und diagnostische Anwendungen von Antikörpern, die für anti-B99-Antikörper in Frage kommen, sind in der WO 95/33771 für beschrieben.

B7

Das TAA der Bezeichnung B99 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von B99-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Nierenzell-, Lungen-, Kolon-, Pankreas- und Magenkarzinom.

Figurenübersicht

Fig. 1: RT-PCR Analyse von cDNA-Pools verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern

Fig. 2: RT-PCR Analyse von individuellen cDNAs verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern

Fig. 3: Transkription von B99 in Normalgeweben:
Northern Blot Analyse von mRNA aus 16 Normalgeweben

Beispiel 1:

RDA („Representational Difference Analysis“) von der humanen Adenokarzinomzelllinie der Lunge (A549) und normalem Lungengewebe

138 135

Die von ATCC bezogene humane Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 (CCL 185) wurde in T150 Zellkulturflaschen hochgezüchtet. Als Nährmedium diente MEM mit 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen durch Trypsinisieren 1:5 bis 1:10 zur Propagation gespalten. Nach Erreichen von etwa 80% Konfluenz wurden pro T150 Zellkulturflasche 4 ml einer Trypsinlösung (Angaben pro Liter: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,13g Na₂HPO₄-wasserfrei, 0,2g KH₂PO₄, 100ml 2,5% Trypsinlösung, 1g EDTA-Na-Salz; pH7,2-7,4) zum Ernten der Zellen eingesetzt. Die 4 ml wurden in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert, mit 8 ml PBS versetzt, bei 1200 rpm in einer Haereus Tischzentrifuge (Megafuge 2.0R) 5 min bei 4°C zentrifugiert, das Zellpellet mit 1 ml Lysis-Puffer (10mM TrisHCl pH8, 140mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% NP40) versetzt, kräftig geschüttelt und in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 12 000 rpm und 4°C 5 min in einer Sigma Tischzentrifuge (Sigma 202 MK) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und nach Zusatz von 55 µl 20% SDS-Lösung zweimal mit dem doppelten Volumen an einer CHCl₃/Phenol (1:1 v/v) Mischung und einmal mit dem einfachen Volumen an CHCl₃ extrahiert. Die wässrige RNA-enhaltende Phase wurde mit 1/10 Volumen an 3M NaAc (pH5) und dem zweifachen Volumen an 96% EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C die RNA präzipitiert. Ausgehend von 1 mg total-RNA wurde für die Isolierung von poly-A(+)RNA mittels des PolyATtract Kit (Promega) entsprechend dem Hersteller-Protokoll vergangen. Die Lagerung der A549 poly-

A(+)RNA mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DEPC-behandeltem H₂O erfolgte in Aliquots bei -80°C.

Zur Durchführung der repräsentativen Differenzanalyse (RDA; Hubank and Schatz, 1994; Diatchenko et al., 1996) wurde die poly-A(+)RNA der Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 als „tester“, die von normalem Lungengewebe (1 mg/ml; Clontech, Palo Alto; #6524-1) als „driver“ eingesetzt. Die RDA wurde unter Verwendung des PCR-select™ kit (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt mit der Ausnahme, daß ein modifiziertes Primer/Adaptor-2-Oligonukleotidsystem mit folgender Sequenz zum Einsatz kam:

5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTACCGAGCTCGAG-3' (Adaptor-2-alt-1; SEQ ID NO:19),
5'-AGGGCGTGGTACCGAGCTCGAG-3' (nested-PCR-primer-2-alt; SEQ ID NO:20) und 5'-GGCTCGAGCTC-3' (Adaptor-2-alt-2; SEQ ID NO:21). Die neu generierten Primer/Adaptor-Sequenzen ermöglichen durch die Anwesenheit von drei neuen Restriktionsenzymchnittstellen (Kpn I, Sac I und Xho I) in der Sequenz des nested-PCR-primer-2-alt nach Klonierung der subtrahierten cDNA-Fragmente in den pPCRII-Vektor ein nachträgliches Herausschneiden der jeweiligen cDNA-Fragmente. Das Designen einer Primer/Adaptorsequenz mit mehreren verfügbaren Restriktionsenzymchnittstellen war deshalb notwendig, weil besonders in den Primersequenzen - bedingt durch die PCR-Amplifikationsschritte - oft Punktmutationen zu beobachten waren.

Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA mittels oligo-dT wurde die erhaltene cDNA von „tester“ und „driver“ mit RsaI verdaut (RsaI ist ein 4-Basen

140

erkennendes Restriktionsenzym und liefert im statistischen Mittel 256 bp lange cDNA-Fragmente). Gleiche Teile von „tester-cDNA“ wurden entweder mit den Adaptoren 1 oder 2 ligiert und anschließend getrennt mit einem Überschuß an „driver-cDNA“ bei 65°C hybridisiert. Danach wurden die beiden Ansätze vereinigt und einer zweiten Hybridisierung mit frischer denaturierter „driver-cDNA“ unterworfen. Die angereicherten „tester“-spezifischen cDNAs wurden anschließend durch PCR mit für die Adaptoren 1 bzw. 2 spezifischen Primern exponentiell amplifiziert. Für eine weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser Reaktion einer zweiten PCR mit spezifischen nach innen versetzten („nested“) Primern unterworfen. Die aus dieser Reaktion resultierenden, exponentiell amplifizierten cDNA-Fragmente wurden direkt in den pCRII-Vektor (Invitrogen; „TA-cloning vector“) ligiert und anschließend ein Drittel des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transfiziert.

712 positive Transformanten (Blau-Weiß-Selektion) wurden erhalten und in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium (1,3 ml pro Napf) für 48 h bei 37°C kultiviert. Pro Napf wurden 750 µl der *E. coli* Suspensionen für die Präparation der Plasmid-DNA eingesetzt (96-Napf-Minipräparationsmethode von QIAGEN nach Vorschrift des Herstellers). Die verbleibenden Bakterienkulturen wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

Es wurde eine aus 712 Einzelklonen bestehende cDNA-Subtraktionsbibliothek erhalten, die sowohl in Form von *E. coli* Glycerin-Stammkulturen als auch in Form gereinigter Plasmide vorlag.

+41

Beispiel 2:

DNA-Sequenzierung und Annotation von TAA-Kandidaten

Die isolierte Plasmid-DNA sämtlicher 712 Klone (siehe
5 Beispiel 1) wurde nach der Sanger-Methode auf einem
ABI-Prism Gerät sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen
wurden mittels der BioScout-Software (LION, Heidelberg)
annotiert und Datenbankvergleichen (Genbank)
unterzogen. Von 712 Klonen konnten 678 sequenziert und
10 annotiert werden. Der Rest (34) wies als Insert
entweder nur poly(A) Sequenzen auf oder entsprach einem
religierten Vektor oder war nicht sequenzierbar. Von
den 678 annotierbaren Sequenzen erwiesen sich 357 als
Gene mit bekannter Funktion. Die restlichen 321
15 repräsentierten Klone, kodierend für Gene mit
unbekannter Funktion; 59 davon wiesen nicht einmal
Einträge in der humanen EST-Datenbank auf. Bekannte
Gene wurden nicht weiter behandelt. Für jene
unbekannten Gene, für die ein EST-Eintrag verfügbar
20 war, wurde eine Abschätzung des Expressionsprofils
vorgenommen: dabei wurden all jene ESTs mit > 95%
Identität (BLAST), die zur entsprechend experimentell
ermittelten Sequenz der Subtraktionsbibliotheken
gehörten, überprüft. Bei der Annotation wurde eine
25 Unterteilung in i) kritische Normalgewebe, ii) foetale,
„verzichtbare“ und immunprivilegierte Gewebe und
iii) Tumore und Tumor-Zelllinien vorgenommen. Auf der
Basis dieses „virtuellen mRNA-Profiles“ wurden
200 Klone, für die keine ESTs in der Gruppe i) gefunden
30 wurden, für weitere experimentelle Analysen ausgewählt

H42

(inklusive der 59 Klone, für die keine EST-Eintragung vorlag). Zur weiteren Einengung der Kandidatenklone wurden aus den von den 200 ausgewählten Klonen ermittelten Sequenzen Oligonukleotidprimerpaare

5 entworfen und synthetisiert. Es wurden zunächst 8 verschiedene, von humanem Gewebe abgeleitete cDNA-Bibliotheken (GibcoBRL „SUPERSCRIPT™“), welche

10 direktional in pCMV-SPORT kloniert sind, mittels qualitativer PCR auf das Vorhandensein der jeweiligen Kandidaten getestet. Die dabei eingesetzten cDNA-

Bibliotheken stammten aus Gewebe von Herz (#10419-018), Leber (#10422-012), Leukozyten (#10421-022), Niere (#10420-016), Lunge (#10424-018), Testis (#10426-013), Gehirn (#10418-010) und fötalem Gehirn (#10662-013).

15 Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 20 µl Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz enthielten 1x TaqPol-Puffer (50mM KCl, 10 mM TrisHCl pH9, 0,1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Promega), 0,025 U/µl Taq-DNA-Polymerase (Promega), jeweils 5 pM an spezifischen

20 Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:8 und 100 ng der jeweils zu untersuchenden Plasmid-DNA. Zur Kontrolle wurden spezifische Primer für GAPDH (SEQ ID NO:14 und 15) eingesetzt. Zur Überprüfung des selektiven Nachweises wurden die Primerpaare parallel

25 auch auf das isolierte Plasmid hin ausgetestet. Die Nachweisbarkeit von Fragmenten der zu erwartenden Länge in einem der kritischen Normalgewebe (Herz, Leber, Lunge, Niere und Leukozyten), nicht jedoch in den cDNA-Bibliotheken aus immunprivilegierten Geweben (Gehirn,

30 fötales Gehirn und Testis) unter diesen PCR-Bedingungen (1 Zyklus: 3' 94°C; 35 Zyklen: 1' 94°C - 1' 55°C - 1' 72°C; 1 Zyklus: 7' 72°C) wurde als

Ausscheidungskriterium definiert. Mittels dieser qualitativen PCR-Analyse konnte die Zahl der Kandidaten auf 56 eingengt werden.

5 Beispiel 3:

Transkriptionelle Analyse der Kandidaten-Klone in verschiedenen Tumor- und Normalgeweben

Für die RT-PCR Analyse wurden cDNA-Pools verwendet die aus je 3 µg total-RNA von 3 verschiedenen Geweben des gleichen Typs hergestellt wurden. Die 9 µg total-RNA pro Gewebepool aus Tumor- oder Normalgeweben wurden mittels AMV-RT (Promega) entsprechend der Herstellerempfehlung revers transkribiert. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit genomischer DNA wurde die RNA vorher mit DNase I (Boehringer Mannheim) inkubiert. Qualität und Menge der cDNAs wurde durch PCR mit GAPDH spezifischen Primern (SEQ ID NO:14 und 15) nach 20 Zyklen (30'' 95°C, 90'' 60°C) überprüft. B99-cDNA wurde durch 25, 30 und 35 Zyklen des Programms 1' 95°C, 1' 55°C, 1' 72°C mit den B99-spezifischen Primern gemäß SEQ ID NO:7 und 8 amplifiziert. Analog wurden die anderen 55 Kandidaten-Klone mit jeweils spezifischen Primern untersucht. Die PCR Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Für 3 der 56 untersuchten Klone konnte mittels RT-PCR eine vermehrte Expression in verschiedenen Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben gezeigt werden. Ein Beispiel für Kandidat B99 ist in Fig. 1 gezeigt: Die RT-PCR Analyse von cDNA-Pools verschiedener humaner Tumor- und

~~141~~

Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern ergab ein starkes Signal im Kolonkarzinom und in der Lungenadenokarzinomlinie A549 sowie ein schwaches Signal im Brustkarzinom und im Nierenzellkarzinom. Von allen

5 untersuchten Normalgeweben war ein schwaches Signal nur in Kolongewebe feststellbar. Im weiteren Verlauf wurde der Kandidat B99 genauer evaluiert.

Beispiel 4:

10 Expressionsprofil von B99 in Tumor- und Normalgeweben

Einer der 56 Kandidaten (Bezeichnung: B99) zeigte mittels RT-PCR Transkription in 3 von 5 getesteten Tumorgewebe-Pools ein Signal. In den meisten getesteten Normalgeweben konnte hingegen keine Transkription

15 festgestellt werden.

Für eine detaillierte Untersuchung der B99-Expression wurden im folgenden cDNAs individueller Tumor- und Normalgewebeproben mittels PCR analysiert. Dabei zeigte sich, daß die Mehrzahl aller untersuchten

20 Kolonkarzinome (17/ 23), alle Pankreaskarzinome (3/ 3) und alle Magenkarzinome (4/4) B99 exprimieren. In entsprechenden Normalgeweben wurde eine Expression in 1/ 4, 0/ 3 bzw. 2/ 4 Fällen nachgewiesen. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt, Fig. 2

25 zeigt exemplarische Ergebnisse für Pankreas- und Kolongewebe: Mittels RT-PCR Analyse von individuellen cDNAs verschiedener humaner Tumor- und Normalgewebe mittels B99-spezifischen Primern konnte in 6 von 7 Tumorproben B99-cDNA nachgewiesen werden, während nur

eines der untersuchten Normalgewebe (1/ 6) eine schwache Expression von B99 zeigte.

Tabelle 1:

Tumorgewebe		Normalgewebe	
Typ	Positive Fälle/ getestete Fälle	Typ	Positive Fälle/ getestete Fälle
Kolonkarzinom	17/ 23	Kolon	1/4
Leberkarzinom	0/3	Leber	0/4
Lungenkarzinom	2/9	Lunge	0/4
Mammakarzinom	0/10	n.d.	
Pankreas- karzinom	3/3	Pankreas	0/4
Nierenzell- karzinom	1/10	Niere	0/4
Magenkarzinom	4/4	Magen	2/4
		Lymphozyten	0/1
		Dünndarm	1/1
		Ovar	0/1
		Testis	0/4
		Prostata	0/1
		Thymus	0/1
		Milz	0/4
		Muskel	0/1
		Gehirn	0/1
		Herz	0/4

+46

- Für die Northern Blot Analyse wurden Human Multiple Tissue Northern blots (Clontech, Palo Alto) mit dem [α - 32 P]dCTP (NEN, Boston) markierten 271 bp B99 PCR
- 5 Produkt bei 65° für 16 h hybridisiert. Die Visualisierung erfolgte durch Standard-Autoradiografie (Xomat AR film, Kodak) und Exposition auf einen Phosphoimager (Molecular Dynamics). Fig. 3 zeigt das Ergebnis dieser Analyse von 16 Normalgeweben. Dabei
- 10 zeigte sich lediglich in Kolon und deutlich schwächer in Duodenum ein Transkript von ~3,0 kb Größe. Die geringe Intensität des Signals läßt jedoch eine immunologisch relevante Expression als unwahrscheinlich erscheinen.
- 15 Das Ergebnis aller Versuche bezüglich des mRNA-Profiles von B99 (kompiliert aus RT-PCR und Northern Blot Analyse) ist in Tab. 1 zusammengefaßt. Beispiel 4 zeigt, daß B99 in einem hohen Prozentsatz von Tumoren verschiedener Indikationen deutlich transkribiert wird,
- 20 während in allen untersuchten Normalgeweben keine oder nur vereinzelte Transkription gefunden wurde.

Beispiel 5:

Klonierung von B99

- 25 Klon B99 besitzt zwischen den durch die RDA eingeführten Adaptoren ein 271 bp langes Insert eines unbekannten humanen Gens. Zur vollständigen Klonierung der humanen Sequenz wurde wie folgt vorgegangen: eine UniGene Analyse (National Center for Biotechnology

Information) ergab folgende zu B99 homologe ESTs:
AA315469, AA345780, AA295520. Mit Hilfe dieser ESTs
konnte die B99 Sequenz auf 439 Nukleotide verlängert
werden. Neue Primer innerhalb dieser Sequenz wurden
5 synthetisiert (SEQ ID NO:9 bis 12). Durch PCR mit
verschiedenen Kombinationen dieser Primer konnten die
jeweiligen theoretischen Fragmentlängen aus A549 cDNA
amplifiziert werden.

Klonierung des 3'-Endes: 10 µg total-RNA aus der
10 Nierenzellkarzinom-Zelllinie 786-0 wurden mittels
Oligo-dT Primer revers transkribiert, und ein Aliquot
dieser cDNA wurde einer PCR unterzogen, deren Programm
mit hohen Annealingtemperaturen beginnt, sodaß nur der
genspezifische Primer an die cDNA bindet (Primer
15 SEQ ID NO:7 bzw. 9), während der zweite Primer ($T_m \sim 53^\circ\text{C}$,
SEQ ID NO:13) erst bei niedrigerer Temperatur an die
neu synthetisierte DNA-Vorlage bindet. Diese sog.
"touch-down PCR" (Mastercycler Gradient, Eppendorf)
wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
20 20 Zyklen {15'' 95°C, 30'' 75°C (reduziert um 0,7°C je
Zyklus)}, 1 Zyklus 7' 72°C, sowie 20 Zyklen (15'' 95°C,
30'' 50°C), 1 Zyklus 7' 72°C}.

Ein Aliquot des obigen Ansatzes wurde mittels einer
zweiten Primerkombination (SEQ ID NO:7 und 13 bzw.
25 SEQ ID NO:12 und 13) unter den gleichen Bedingungen wie
vorher erneut PCR amplifiziert. Aliquots der PCR-
Ansätze wurden direkt in den pGEM-T easy-Vektor
(Promega) ligiert und anschließend in kompetente *E.*
coli J109 (Promega) transformiert. Positive Klone
30 wurden nach PCR-Selektion sequenziert. Die
Sequenzierung ergab eine Übereinstimmung mit der

bisherigen Sequenz ab dem für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer und darüberhinaus 1777 zusätzliche Nukleotide bis zum Beginn einer PolyA-Sequenz im 3'-Bereich der Sequenz. PCR Amplifikation von cDNA aus Tumorzelllinien (786-0, A549) sowie Gewebeproben von Kolonkarzinomen mit den Primern gemäß SEQ ID NO: 16 bis 18 ergaben mit den ursprünglichen Primern die nach der Klonierung erwarteten Fragmente. In dem nunmehr aus 2216 bp bestehenden cDNA-Fragment konnte ein durchgehender Leserahmen von Pos. 427 bis 1743 identifiziert werden. Weiter im 5'-Bereich der Sequenz konnten keine zusätzlichen Leserahmen identifiziert werden, woraus zu schließen ist, daß der Bereich von 0 bis 427 bereits zum 5'-nicht translatierten Bereich der B99 mRNA gehört.

Mit Hilfe der Primer SEQ ID NO:12 und SEQ ID NO:17 wurde der gesamte kodierende Bereich von B99 aus A549-cDNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. Bei der Sequenzierung wurden mehrere Klone mit einer Insertion von einem Nukleotid an Pos. 923 im Vergleich zu SEQ ID NO:1 (kodiert für B99-1) erhalten (SEQ ID NO:3 bzw. SEQ ID NO:5).

Diese Insertion führt zu einer Veränderung des offenen Leserahmens von B99 mit einer daraus resultierenden veränderten Aminosäuresequenz im C-terminalen-Bereich des B99-Proteins; die von diesem Leserahmen abgeleitete Sequenz des B99-Antigens (B99-2) ist in SEQ ID NO:4 dargestellt.

Einer der aus A549-Zellen isolierten Klone zeigte neben der genannten Insertion einen Nukleotidaustausch an

HAT

Position 622 im Vergleich zu Sequenz SEQ ID NO:1 auf. Dieser Nukleotidaustausch bedingt an Position Nr. 66 der Aminosäuresequenz einen Ersatz von Arginin (SEQ ID NO:2, B99-1) durch Tryptophan (SEQ ID NO:4, B99-2). Abgesehen von diesem Aminosäureaustausch ist die Aminosäuresequenz von B99-2 bis zu Position 166 identisch mit B99-1.

Darüberhinaus bedingt die genannte Insertion einen zweiten potentiellen Leserahmen von Pos. 845 bis 1744 der in SEQ ID NO:3 (bzw. SEQ ID NO:5) dargestellten Sequenz. Ein von einer cDNA mit diesem Leserahmen exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:6 dargestellte Aminosäuresequenz auf (B99-3). Die Sequenz von B99-3 ist von Pos. 1 bis 27 unterschiedlich zu B99-1 und ab Pos. 28 identisch mit B99-1.

Beispiel 6:

Potentielle MHC-Bindungspeptide in der kodierenden Region von B99

Potentielle Peptid-Epitope innerhalb der kodierenden Region von B99-1 gemäß SEQ ID NO: 2 (Aminosäureposition: 1-438; Tab. 2A), von B99-2 gemäß SEQ ID NO:4 (Aminosäureposition 150-190; Tab. 2B) und von B99-3 gemäß SEQ ID NO:6 (Aminosäureposition 1-40; Tab. 2C) wurden mittels den von Parker et. al., 1994 beschriebenen Algorithmen unter Zugrundelegung bekannter Motive (Rammensee et al. 1995) durchgeführt. Für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1, -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, wurden 9-mer

Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

- 5 Durch analoges Vorgehen können weitere potentielle Peptid-Epitope für andere HLA-Typen bzw. 8- und 10-mer Peptide ermittelt werden.

151

Tabelle 2A

Immunogene B99-Peptid-Kandidaten (B99-1)

Start-position in SEQ ID NO:2	Sequenz	HLA
5	Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu	B14
12	Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met	A*0201
85	Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys	A3
90	Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe	A3
95	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr	B*4403
96	Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu	B7
123	Pro Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Phe	A3
127	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr	B*4403
147	Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala	B14

152

149

187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	A*0201
206	Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu	A*0201
251	Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys	A1, A3
275	Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys	A3
305	Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys	A3
318	Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr	A1
400	Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu	A*0201
407	Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys	A3
413	Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu	B7
422	Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr	A1
423	Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys	A1, A3

~~153~~

Tabelle 2B

Immunogene B99-Peptid-Kandidaten (B99-2)

Start- position in SEQ ID NO:4		
152	Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr	A1, A3
154	Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr Cys Val	A*0201
160	Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val	A*0201
163	His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn	A1
164	Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe	A1, B*4403
172	Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr	A1
177	Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys	A1
182	Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln	A*0201

154 151

Tabelle 2C

Immunogene B99-Peptid-Kandidaten (B99-3)

Start- position in SEQ ID NO:6		
2	Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr	A1, B14
5	Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu	A*0201
10	Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg	A1
12	Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr	A1, A3
14	Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val	A*0201
16	Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met	A*0201

155/152

Literatur

- 5 Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga, J., and Knop, J. (1997), J. Immunol. Methods 203, 171-180.
- Blake, J., Johnston, J.V., Hellström, K.E., Marquardt, H., and, Chen, L. (1996), J. Exp. Med. 184, 121-130.
- 10 Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, and A. Van Pel (1994), Annu.Rev.Immunol. 12: 337-365
- 15 Boon T , (1998). Tumor antigens recognized by cytolytic T cells. Cancer Vaccine Week - Interantional Symposium, New York, Oct 1998; abstract S01
- 20 Boulianne, G. L., et al., (1984), Nature 312: 643-646
- Brüggemann, M. und Neuberger, M.S., (1996), Immunol. Today 17: 391-397
- 25 Buschle M, Schmidt W, Zauner W, Mechtler K, Trska B, Kirlappos H, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:3256-3261
- Celluzzi, CM and Falo, LD, Jr. (1998), J. Immunol. 160: 3081-3085
- 30

156/153

Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 1914-1918.

5

Coulie, P.G. (1997), Mol. Med. Today 3: 261-268

Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow, TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, and

10 Slingluff, CL, Jr. (1994), Science 264: 716-719

Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996),

15 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6025-6030.

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993), Proc. Natl. Acad.

20 Sci. U. S. A 90: 3539-3543.

Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J (1985), J. Virol. 55: 836-839

25 Falk, K., Röttschke, O., Stevanovi'c, S., Jung, G., and Rammensee, H-G (1991), Nature 351: 290-296.

Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H.I., Simons, J.W., Karasuyama, H.,

30 Vogelstein, B., and Frost, P. (1990), Cell 60: 397-403.

Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K.,
Bannerji, R., and Gilboa, E. (1990), J. Exp. Med. 172:
1217-1224.

- 5 Graziano, R.F., et al., (1995), J. Immunol. 155:
4996-5002

Griffiths, A.D., et al., (1994), EMBO J. 13: 3245-3260

- 10 Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, and
Barnetson RS (1995), World J. Surg. 19: 352-358

Hubank, M. and Schatz, D.G., (1994), Nucleic. Acids.
Res. 22, 5640-5648.

15

Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J.,
Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H.,
Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J., and Knuth, A.
(1998), J. Exp. Med. 187, 265-270.

20

Jakobovits, A., (1995), Curr. Opin. Biotechnol. 6:
561-566

- Jameson, BA and Wolf, H (1988) The antigenic index: a
25 novel algorithm for predicting antigenic determinants.
Comput. Appl. Biosci. 4: 181-186

Jessup, JM and Loda, M (1998) Prognostic markers in
rectal carcinoma. Semin. Surg. Oncol. 15: 131-140.

30

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K.,
King, X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A.,

158 155

Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1995), J. Immunol.
154: 3961-3968.

Kawakami, Y, Robbins, PF, and Rosenberg, SA (1996),
5 Keio J. Med. 45: 100-108

Köhler, G. und Milstein, C. (1975), Nature 265, 495-497

Kruif, J., et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci.
10 USA 92: 3938-3942

Kyte, J and Doolittle, RF (1982), J. Mol. Biol. 157:
105-132

15 Lethe, B, Lucas, S, Michaux, L, De Smet, C, Godelaine,
D, Serrano, A, De Plaen, E, and Boon, T (1998), Int. J.
Cancer 76: 903-908

Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure
20 F, Viel S, and Hercend T (1993), Cancer Res. 53:
3569-3573

Marchand M, Weynants P, Rankin E et al (1995), Int. J.
Cancer 63:883-885

25 Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel,
L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad,
S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., and Lotze, M.T. (1995),
Nature Medicine 1, 1297-1302.

30 McGuinness, B.T., et al., (1996), Nature Biotechnol. 14,
1149

Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), Curr. Opin. Immunol. 8:651-657

- 5 Murphy, G.P., Elgamal, A.A., Su, S.L., Bostwick, D.G., and Holmes, E.H. (1998), Cancer 83, 2259-2269

Neuberger, M.S., et al., (1984), Nature 312: 604-608

- 10 Pardoll, D. M. (1998) Nature Medicine 4: 525-531

Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. (1994), J. Immunol. 152:163.

- 15 Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Kawakami, Y. (1996), J. Immunol. 157, 2539-2548.

- Paterson Y, Ikonomidis G (1996), Curr. Opin. Immunol. 5: 664-9

Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995), Immunogenetics 41:178-228

- 25 Rapellino, M, Pecchio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, and Cavallo, A (1995), Anticancer Res. 15: 1065-1070

Ravaioli, A., Bagli, L., Zucchini, A., and Monti, F. (1998), Cell. Prolif. 31, 113-126

30

Revillion, F, Bonnetterre, J, and Peyrat, JP (1998), Eur. J. Cancer 34: 791-808

160 157

Restifo NP (1996), Curr. Opin. Immunol. 5: 658-63

Riechmann, L., et al., (1988), Nature 332: 323-327

5

Robbins, PF and Kawakami, Y (1996), Curr. Opin. Immunol. 8: 628-636

Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., and Sette, A. (1993), Cell 74, 929-937.

10

Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995), Proc. Natl.

15 Acad. Sci. U.S.A. 92, 11810-11813

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989

20

Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, and Segurado OG (1993), J. Immunol. 151: 4209-4220

25 Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kirlappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94:3262-3267

Schweighoffer, T. (1997), Onc. Res. 3, 164-176

30

Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C.,

- Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-F., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., and Chisari, F.V. (1994), J. Immunol. 153, 5586-5592.
- 5 Stauss, H.J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., and Sinclair, C. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89, 7871-7875.
- 10 Tepper, R.I., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1989), Cell 57: 503-512.
- Tighe H, Corr, M, Roman M, and Raz E (1998), Immunol. Today 19:89-97
- 15 Toes, R.E., Hoebe, R.C., Van der Voort, E., Rensing, M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (26): 14660-14665
- 20 Tuting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., and Storkus, W.J., (1997), Eur. J. Immunol. 27, 2702-2707,.
- Van den Eynde, B. and Brichard, V.G. (1995), Curr. Opin. Immunol. 7, 674-681.
- 25 Van den Eynde, BJ, and van der Bruggen, P (1997), Curr. Opin. Immunol. 9:684-693
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon. (1991, Science 254:1643-1647
- 30

- Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, and Falk, K (1994), Int. J. Cancer 57: 413-418
- 5 Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(25): 11671-11675.
- 10 Zitvogel, L., Mayordomo, J.I., Tjandrawan, T., DeLeo, A.B., Clarke, M.R., Lotze, M.T., and Storkus, W.J. (1996), J. Exp. Med. 183, 87-97.

161
~~161~~

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH

(B) STRASSE: Binger Strasse 173

(C) ORT: Ingelheim am Rhein

10

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: D-55216

(G) TELEFON: ++49-6132-77-2282

(H) TELEFAX: +49-6132-77-4377

15

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Tumor-assoziiertes Antigen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 55

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

20

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25

166 163

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTCACGGGAA CTGCOCTTGC TACTTGTGAC CTGCOCTTTA CTCAGCAGTT TTTGTTCTGG 60
 5 GAAGCOCTGG GATTCTGCTA ATACCTATCA CTGTAGGTGC TGAAGGGAAA CAGATGAAGA 120
 ACATGAOCTC AAGGAGCTTC CTGTCAATGA GAAGAOCAG CTGAAGCOCTG GCAAAGATAT 180
 TAAAGAGGAG CCTGAAACTG TTCCCTGGAC ATCTTATGAA TGTCAGAAAA TAOCTTTTGG 240
 10 AGGGTTAGAA GATCAGGGGA CATGGTTGTT CACATTTGCT GOCACGGAAC AOCGOCAGTC 300
 TTCACTTGGG AACAGAATCA OGCTTGTGA AGAGATCATC OCTAAGCAGG AGAGAAGCTA 360
 15 CTAAAGGATT GTGTACTOCT CCAOCTTCCC TGTGCTGGT CTCCACTGT CTCCATTCT 420
 GTGACG ATG GTT CAA TGG AAG AGA CTC TGC CAG CTG CAT TAC TTG TGG 468
 Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp
 1 5 10
 20 GCT CTG GGC TGC TAT ATG CTG CTG GOC ACT GTG GCT CTG AAA CTT TCT 516
 Ala Leu Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser
 15 20 25 30
 25 TTC AGG TTG AAG TGT GAC TCT GAC CAC TTG GGT CTG GAG TCC AGG GAA 564
 Phe Arg Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu
 35 40 45

~~167~~

60

	TCT CAA AGC CAG TAC TGT AGG AAT ATC TTG TAT AAT TTC CTG AAA CTT	612
	Ser Gln Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu	
	50 55 60	
5	OCA GCA AAG AGG TCT ATC AAC TGT TCA GGG GTC ACC CGA GGG GAC CAA	660
	Pro Ala Lys Arg Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln	
	65 70 75	
	GAG GCA GTG CTT CAG GCT ATT CTG AAT AAC CTG GAG GTC AAG AAG AAG	708
10	Glu Ala Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys	
	80 85 90	
	OGA GAG OCT TTC ACA GAC ACC CAC TAC CTC TCC CTC ACC AGA GAC TGT	756
	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys	
15	95 100 105 110	
	GAG CAC TTC AAG GCT GAA AGG AAG TTC ATA CAG TTC OCA CTG AGC AAA	804
	Glu His Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys	
	115 120 125	
20	GAA GAG GTG GAG TTC OCT ATT GCA TAC TCT ATG GTG ATT CAT GAG AAG	852
	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys	
	130 135 140	
25	ATT GAA AAC TTT GAA AGG CTA CTG CGA GCT GTG TAT GGC OCT CAG AAC	900
	Ile Glu Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn	
	145 150 155	

168 165

	ATA TAC TGT GTC CAT GTG GAT GAG AAG TOC OCA GAA ACT TTC AAA GAG	948
	Ile Tyr Cys Val His Val Asp Glu Lys Ser Pro Glu Thr Phe Lys Glu	
	160 165 170	
5	GCG GTC AAA GCA ATT ATT TCT TGC TTC OCA AAT GTC TTC ATA GGC AGT	996
	Ala Val Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val Phe Ile Ala Ser	
	175 180 185 190	
	AAG CTG GTT OGG GTG GTT TAT GGC TOC TGG TOC AGG GTG CAA GCT GAC	1044
10	Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val Gln Ala Asp	
	195 200 205	
	CTC AAC TGC ATG GAA GAC TTG CTC CAG AGC TCA GTG CCG TGG AAA TAC	1092
	Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val Pro Trp Lys Tyr	
15	210 215 220	
	TTC CTG AAT ACA TGT GGG ACG GAC TTT OCT ATA AAG AGC AAT GCA GAG	1140
	Phe Leu Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser Asn Ala Glu	
	225 230 235	
20	ATG GTC CAG GCT CTC AAG ATG TTG AAT GGG AGG AAT AGC ATG GAG TCA	1188
	Met Val Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn Ser Met Glu Ser	
	240 245 250	
25	GAG GTA OCT OCT AAG CAC AAA GAA ACC CGC TGG AAA TAT CAC TTT GAG	1236
	Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr His Phe Glu	
	255 260 265 270	

169
166

	GTA GTG AGA GAC ACA TTA CAC CTA ACC AAC AAG AAG AAG GAT OCT OCC	1284
	Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys Asp Pro Pro	
	275 280 285	
5	OCT TAT AAT TTA ACT ATG TTT ACA GGG AAT GCG TAC ATT GTG GCT TOC	1332
	Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Ala Ser	
	290 295 300	
	CGA GAT TTC GTC CAA CAT GTT TTG AAG AAC OCT AAA TOC CAA CAA CTG	1380
10	Arg Asp Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser Gln Gln Leu	
	305 310 315	
	ATT GAA TGG GTA AAA GAC ACT TAT AGC CCA GAT GAA CAC CTC TGG GOC	1428
	Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His Leu Trp Ala	
15	320 325 330	
	ACC CTT CAG CGT GCA CGG TGG ATG OCT GGC TCT GTT OCC AAC CAC OCC	1476
	Thr Leu Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro Asn His Pro	
	335 340 345 350	
20	AAG TAC GAC ATC TCA GAC ATG ACT TCT ATT GCC AGG CTG GTC AAG TGG	1524
	Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu Val Lys Trp	
	355 360 365	
25	CAG GGT CAT GAG GGA GAC ATC GAT AAG GGT GCT OCT TAT GCT OCC TGC	1572
	Gln Gly His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr Ala Pro Cys	
	370 375 380	

170

	TCT GGA ATC CAC CAG OGG GCT ATC TGC GTT TAT GGG GCT GGG GAC TTG	1620
	Ser Gly Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala Gly Asp Leu	
	385 390 395	
5	AAT TGG ATG CTT CAA AAC CAT CAC CTG TTG GCC AAC AAG TTT GAC OCA	1668
	Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro	
	400 405 410	
	AAG GTA GAT GAT AAT GCT CTT CAG TGC TTA GAA GAA TAC CTA OGT TAT	1716
10	Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr	
	415 420 425 430	
	AAG GCC ATC TAT GGG ACT GAA CTT TGA GACACACTAT GAGAGOGTTG	1763
	Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *	
15	435	
	CTAOCCTGTGG GGCAAGAGCA TGTACAAACA TGCTCAGAAC TTGCTGGGAC AGTGTGGGTG	1823
	GGAGACCAGG GCTTTGCAAT TGTGGCATC CTTTAGGATA AGAGGGCTGC TATTAGATTG	1883
20	TGGGTAAGTA GATCTTTTGC CTTCGAAATT GCTGCOCTGGG TGAATGCTGC TTGTTCTOOC	1943
	ACCOCTAACC CTAGTAGTTC CTCACCTAAC TTTCTCACTA AGTGAGAATG AGAACTGCTG	2003
25	TGATAGGGAG AGTGAAGGAG GGATATGTGG TAGAGCACTT GATTTCACTT GAATGCOCTGC	2063
	TGGTAGCTTT TCCATTCTGT GGAGCTGCOG TTCTTAATAA TTCCAGGTTT GGTAGOGTGG	2123

AGGAGAACTT TGATGGAAG AGAACTTCC CTCTGTACT GTTAACTAA AAATAAATAG 2183

CTCTGATTC AAAGTAAAAA AAAAAAAAAA AAA 2216

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 439 Aminosäuren

10 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

15

Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp Ala Leu

1 5 10 15

Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser Phe Arg

20 20 25 30

Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu Ser Gln

35 40 45

25 Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu Pro Ala

50 55 60

172 169

65

Lys Arg Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln Glu Ala

65 70 75 80

Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu

5 85 90 95

Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys Glu His

100 105 110

10 Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys Glu Glu

115 120 125

Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys Ile Glu

130 135 140

15

Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr

145 150 155 160

Cys Val His Val Asp Glu Lys Ser Pro Glu Thr Phe Lys Glu Ala Val

20 165 170 175

Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val Phe Ile Ala Ser Lys Leu

180 185 190

25 Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val Gln Ala Asp Leu Asn

195 200 205

173 170

Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val Pro Trp Lys Tyr Phe Leu

210

215

220

Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser Asn Ala Glu Met Val

5

225

230

235

240

Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn Ser Met Glu Ser Glu Val

245

250

255

10

Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr His Phe Glu Val Val

260

265

270

Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys Asp Pro Pro Pro Tyr

275

280

285

15

Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Ala Ser Arg Asp

290

295

300

Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser Gln Gln Leu Ile Glu

20

305

310

315

320

Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His Leu Trp Ala Thr Leu

325

330

335

25

Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro Asn His Pro Lys Tyr

340

345

350

174

171

Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu Val Lys Trp Gln Gly

355

360

365

His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr Ala Pro Cys Ser Gly

5

370

375

380

Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala Gly Asp Leu Asn Trp

385

390

395

400

10

Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys Val

405

410

415

Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys Ala

420

425

430

15

Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *

435

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2217 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

25

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

175

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(F) GEWEBETYP: Lungenkarzinom

5

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LAGE:1..426

10

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:427..999

15

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE:1000..2217

20

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LAGE:1..844

25

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:845..1744

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE:1745..2217

176 173

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

1 GTCACGGGAA CTGCOCTTGC TACTTGTGAC CTGCOCTTTA CTCAGCAGTT TTTGTTCTGG 60
 5 GAAGCOCTGG GATTCTGCTA ATA OCTATCA CTGTAGGTGC TGAAGGGAAA CAGATGAAGA 120
 ACATGACCTC AAGGAGCTTC CTGTCAATGA GAAGACCAAG CTGAOGCTG GCAAAGATAT 180
 TAAAGAGGAG CCTGAACTG TTCTTGGAC ATCTTATGAA TGTCAGAAAA TACCTTTTGG 240
 10 AGGGTTAGAA GATCAGGGGA CATGGTTGTT CACATTTGCT GOCAGGAAC AOCGOCAGTC 300
 TTCACTTGGG AACAGAATCA OGCTTGTGA AGAGATCATC OCTAAGCAGG AGAGAAGCTA 360
 15 CTAAAGGATT GTGTACTOCT OCAOCTTOCC TGTGCTOGGT CTCACCTGT CTCOCATTCT 420
 GTGAGC ATG GTT CAA TGG AAG AGA CTC TGC CAG CTG CAT TAC TTG TGG 468
 Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp
 1 5 10
 20 GCT CTG GGC TGC TAT ATG CTG CTG GOC ACT GTG GCT CTG AAA CTT TCT 516
 Ala Leu Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser
 15 20 25 30
 25 TTC AGG TTG AAG TGT GAC TCT GAC CAC TTG GGT CTG GAG TOC AGG GAA 564
 Phe Arg Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu
 35 40 45

~~177~~

	TCT CAA AGC CAG TAC TGT AGG AAT ATC TTG TAT AAT TTC CTG AAA CTT	612
	Ser Gln Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu	
	50 55 60	
5	CCA GCA AAG TGG TCT ATC AAC TGT TCA GGG GTC ACC OGA GGG GAC CAA	660
	Pro Ala Lys Trp Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln	
	65 70 75	
	GAG GCA GTG CTT CAG GCT ATT CTG AAT AAC CTG GAG GTC AAG AAG AAG	708
10	Glu Ala Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys	
	80 85 90	
	OGA GAG CCT TTC ACA GAC ACC CAC TAC CTC TOC CTC ACC AGA GAC TGT	756
	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys	
15	95 100 105 110	
	GAG CAC TTC AAG GCT GAA AGG AAG TTC ATA CAG TTC CCA CTG AGC AAA	804
	Glu His Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys	
	115 120 125	
20	GAA GAG GTG GAG TTC OCT ATT GCA TAC TCT ATG GTG ATT CAT GAG AAG	852
	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys	
	130 135 140	
25	ATT GAA AAC TTT GAA AGG CTA CTG OGA GCT GTG TAT GOC OCT CAG AAC	900
	Ile Glu Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn	
	145 150 155	

178 175

ATA TAC TGT GTC CAT GTG GAT GAA GAA GTC CCC AGA AAC TTT CAA AGA 948
 Ile Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe Gln Arg
 160 165 170

5 GGC GGT CAA AGC AAT TAT TTC TTG CTT CCC AAA TGT CTT CAT AGC CAG 996
 Gly Gly Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln
 175 180 185 190

TAA GCTGGTTCGG GTGGTTTATG OCTCTGGTC CAGGGTGCAA GCTGAOCTCA 1049
 10 *

ACTGCATGGA AGACTTGCTC CAGAGCTCAG TGOOGTGGAA ATACTTOCTG AATACATGTG 1109

15 GGACGGACTT TCCTATAAAG AGCAATGCAG AGATGGTOCA GGCTCTCAAG ATGTTGAATG 1169

GGAGGAATAG CATGGAGTCA GAGGTACCTC CTAAGCACAA AGAAACCCGC TGGAAATATC 1229

ACTTTGAGGT AGTGAGAGAC ACATTACACC TAACCAACAA GAAGAAGGAT OCTCCCCCTT 1289
 20

ATAATTTAAC TATGTTTACA GGAATGOGT ACATTTGTGGC TTCCCGAGAT TTGTGTTAAC 1349

ATGTTTGAAG GAACCTAAA TCCCAACAAC TGATTGAATG GGTAAAAGAC ACTTATAGCC 1409

25 CAGATGAACA OCTCTGGGOC ACCCTTCAGC GTGCAOGGTG GATGOCTGGC TCTGTTCCCA 1469

ACCACCCCAA GTAAGACATC TCAGACATGA CTTCTATTGC CAGGCTGGTC AAGTGGCAGG 1529

GTCATGAGGG AGACATOGAT AAGGGTGCTC CTTATGCTCC CTGCTCTGGA ATCCACCAGC 1589
 GGGCTATCTG CGTTTATGGG GCTGGGGACT TGAATTGGAT GCTTCAAAAC CATCACTGT 1649
 5 TGGCCAACAA GTTTGACCCA AAGGTAGATG ATAATGCTCT TCAGTGCTTA GAAGAATAOC 1709
 TACGTTATAA GGOCATCTAT GGGACTGAAC TTTGAGACAC ACTATGAGAG CGTTGCTAOC 1769
 TGTGGGGCAA GAGCATGTAC AAACATGCTC AGAACTTGCT GGGACAGTGT GGGTGGGAGA 1829
 10 CCAGGGCTTT GCAATGTGTG GCATCCTTTA GGATAAGAGG GCTGCTATTA GATTGTGGGT 1889
 AAGTAGATCT TTTGCTTGC AAATTGCTGC CTGGGTGAAT GCTGCTTGT CTCTCAOCC 1949
 15 TAAOCTAGT AGTTCTOCA CTAACCTTCT CACTAAGTGA GAATGAGAAC TGCTGTGATA 2009
 GGGAGAGTGA AGGAGGGATA TGTGGTAGAG CACTTGATTT CAGTTGAATG OCTGCTGGTA 2069
 GCTTTTCCAT TCTGIGGAGC TGOCTTCT AATAATTCCA GGTTCGTAG CGTGGAGGAG 2129
 20 AACCTTGATG GAAAGAGAAC CTTCCTTCT GTACTGTAA CTAAAAATA AATAGCTOCT 2189
 GATTCAAAGT AAAAAAAAAA AAAAAAA 2217
 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

180 AT

(A) LÄNGE: 191 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp Ala Leu

1 5 10 15

10

Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser Phe Arg

20 25 30

Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu Ser Gln

15 35 40 45

Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu Pro Ala

50 55 60

20 Lys Trp Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln Glu Ala

65 70 75 80

Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu

85 90 95

25

Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys Glu His

100 105 110

178 178

Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys Glu Glu

115

120

125

Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys Ile Glu

5

130

135

140

Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr

145

150

155

160

10 Cys Val His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe Gln Arg Gly Gly

165

170

175

Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln *

180

185

190

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

20

(A) LÄNGE: 2217 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

182

(F) GEWEBETYP: Lungenkarzinom

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LAGE:1..844

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:845..1744

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE:1745..2217

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GTCAOGGGAA CTGCOCTTGC TACTTGTGAC CTGCOCTTTA CTCAGCAGTT TTTGTTCTGG 60

GAAGOCCTGG GATTCTGCTA ATAOCCTATCA CTGTAGGTGC TGAAGGGAAA CAGATGAAGA 120

ACATGAOCTC AAGGAGCTTC CTGTCAATGA GAAGACCAAG CTGAOGCCTG GCAAAGATAT 180

TAAAGAGGAG CCTGAAACTG TTCCTTGGAC ATCTTATGAA TGTGAGAAAA TACCTTTTGG 240

AGGGTTAGAA GATCAGGGGA CATGGTTGTT CACATTTGCT GCCACGGAAC ACOGOCAGTC 300

TTCACTTGGG AACAGAATCA CGCCTTGTGA AGAGATCATC OCTAAGCAGG AGAGAAGCTA 360

184 181

	TTC ATA GOC AGT AAG CTG GTT OGG GTG GTT TAT GOC TOC TGG TOC AGG	1033
	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg	
	50 55 60	
5	GTG CAA GCT GAC CTC AAC TGC ATG GAA GAC TTG CTC CAG AGC TCA GTG	1081
	Val Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	
	65 70 75	
	COG TGG AAA TAC TTC CTG AAT ACA TGT GGG ACG GAC TTT OCT ATA AAG	1129
10	Pro Trp Lys Tyr Phe Leu Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys	
	80 85 90 95	
	AGC AAT GCA GAG ATG GTC CAG GCT CTC AAG ATG TTG AAT GGG AGG AAT	1177
	Ser Asn Ala Glu Met Val Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn	
15	100 105 110	
	AGC ATG GAG TCA GAG GTA OCT OCT AAG CAC AAA GAA ACC CGC TGG AAA	1225
	Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys	
	115 120 125	
20	TAT CAC TTT GAG GTA GTG AGA GAC ACA TTA CAC CTA ACC AAC AAG AAG	1273
	Tyr His Phe Glu Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys	
	130 135 140	
25	AAG GAT OCT CCC OCT TAT AAT TTA ACT ATG TTT ACA GGG AAT GCG TAC	1321
	Lys Asp Pro Pro Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr	
	145 150 155	

186 183

	AAG TTT GAC OCA AAG GTA GAT GAT AAT GCT CTT CAG TGC TTA GAA GAA	1705
	Lys Phe Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu	
	275 280 285	
5	TAC CTA CGT TAT AAG GGC ATC TAT GGG ACT GAA CTT TGA GACACACTAT	1754
	Tyr Leu Arg Tyr Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *	
	290 295 300	
10	GAGAGGGTTG CTACCTGTGG GGCAAGAGCA TGTACAAACA TGCTCAGAAC TTGCTGGGAC	1814
	AGTGTGGGTG GGAGACCAGG GCTTTGCAAT TGTGGGCATC CTTTAGGATA AGAGGGCTGC	1874
	TATTAGATTG TGGGTAAGTA GATCTTTTGC CTGCAAATT GCTGCTGGG TGAATGCTGC	1934
15	TTGTTCTCTC AOOCTAACC CTAGTAGTTC CTCACTAAC TTCTCTACTA AGTGAGAATG	1994
	AGAACTGCTG TGATAGGGAG AGTGAAGGAG GGATATGTGG TAGAGCACTT GATTTTCAGTT	2054
	GAATGCTGCTG TGGTAGCTTT TCCATTCTGT GGAGCTGCGG TTCTTAATAA TTCCAGGTTT	2114
20	GGTAGCGTGG AGGAGAACTT TGATGGAAAG AGAACCTTCC CTTCTGTACT GTTAACTTAA	2174
	AAATAAATAG CTCTGATTTC AAAGTAAAAA AAAAAAAAAA AAA	2217

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 300 Aminosäuren

5 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

10

Met Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro

1 5 10 15

Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met Trp Met Lys Lys Ser Pro Glu Thr

15 20 25 30

Phe Lys Glu Ala Val Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val Phe

35 40 45

20 Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val

50 55 60

Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val Pro

65 70 75 80

25

Trp Lys Tyr Phe Leu Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser

85 90 95

100 105 110

5	115	120	125
---	-----	-----	-----

130 135 140

145 150 155 160

165 170 175

180 185 190

20 195 200 205

210 215 220

225 230 235 240

189/186

Ala Pro Cys Ser Gly Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala
245 250 255

5 Gly Asp Leu Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys
260 265 270

Phe Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr
275 280 285

10 Leu Arg Tyr Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *
290 295 300

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 25 bp
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

TCAATGAGAA GACCAAGCTG ACGCC 23

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 22 bp
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

35

190
187

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

5

GGGAGACAGG TGGAGACCGA GC

23

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 bp

(B) ART: Nukleinsäure

15

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

20

TCACGGGAAC TGCCCTTGCT ACTTGT

23

19/188

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 bp

5 (B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GCTCCTTGAG GTCATGTTCT TCATCTG

27

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 bp

20 (B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GGAGACCGAG CACAGGGAAG G

21

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 bp

35 (B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

192
189

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CCTTCCCTGT GCTCGGTCTC C

21

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

(A) LÄNGE: 20 bp

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TCGAGTCGAC TATATGTACC

20

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

25

(A) LÄNGE: 22 bp

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AAGGTGAAGG TCGGAGTCAA CG

22

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

193
190

- (A) LÄNGE: 24 bp
- (B) ART: Nukleinsäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GGCAGAGATG ATGACCCTTT TGGC

24

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- 15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 27 bp
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

GACCAGGAGG CATAAACCAC CCGAACC

27

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- 30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 28 bp
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TTCCATCAAA GTTCTCCTCC ACGCTACC

28

194 191

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 5 (A) LÄNGE: 28 bp
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

CATCCAATTC AAGTCCCCAG CCCCATAA

28

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 20 (A) LÄNGE: 43 bp
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

TG TAGCGTGA AGACGACAGA AAGGGCGTGG TACCGAGCTC GAG

43

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 35 (A) LÄNGE: 22 bp
(B) ART: Nukleinsäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

195 192

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

AGGGCGTGGT ACCGAGCTCG AG

22

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

(A) LÄNGE: 11 bp

(B) ART: Nukleinsäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Desoxyribonukleotid

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

GGCTCGAGCT C

11

20

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

25

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:22:

30

Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu

1

5

9

35

196 193

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

5 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:23:

10 Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met

1

5

9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:24:

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:24:

Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys

1

5

9

25

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:25:

35

Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe

1

5

9

~~197~~ 194

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:26:

10

Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr

1

5

9

15 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:27:

Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu

25

1

5

9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:28:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:28:

198 195

Pro Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Phe

1 5 9

5 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

10 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:29:

Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr

15 1 5 9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:30:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:30:

Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala

1 5 9

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

35 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:31:

5 1 5 9

```

10      (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
      (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
      (B) ART: Aminosäure
      (D) TOPOLOGIE: linear

```

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:32:

1 5 9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:33:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:33:

1 5 9

200
197

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

5 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:34:

10 Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys

1

5

9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:35:

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:35:

Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys

1

5

10

25

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:36:

35

Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr

1

5

9

204 198

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:37:

10

Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu

1

5

9

15 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

20

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:38:

Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys

25

1

5

9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:39:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:39:

202 199

Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu
1 5 9

5 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

10 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:40:

Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr
15 1 5 9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:41:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:41:

Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys
1 5 9

30

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:42:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

35 (B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

203
200

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:42:

Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr

1 5 9

5

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:43:

15

Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr Cys Val

1 5 9

20 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

25 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:44:

Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val

30 1 5 9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:45:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

204

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:45:

5

His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn

1

5

9

10 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:46:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

15

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:46:

Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe

20

1

5

9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:47:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:47:

Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr

1

5

9

205

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

5

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:48:

10 Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys

1

5

9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:49:

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:49:

Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln

1

5

9

25

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:50:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:50:

35

Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr

1

5

9

203
206

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:51:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 5 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:51:

10

Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu

1 5 9

15 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:52:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:52:

Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg

25 1 5 9

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:53:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 30 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:53:

35

Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr

1 5 9

~~207~~ 204

2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:54:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 5 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:54:

10

Cys Met Pro Leu Arg Thr Thr Val

1 5 9

15 2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:55:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

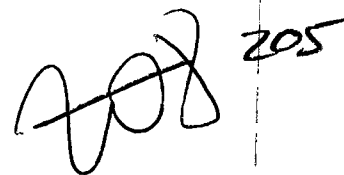
- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
20 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:55:

Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met

25 1 5 9



Patentansprüche

1. Tumorassoziertes Antigen der Bezeichnung B99,
ausgewählt aus der Gruppe von Polypeptiden mit der
5 in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:6
angegebenen Aminosäuresequenz.
2. Immunogenes Proteinfragment oder Peptid, dadurch
gekennzeichnet, daß es von einem in Anspruch 1
definierten tumorassozierten Antigen abgeleitet
10 ist.
3. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2,
das eine humorale Immunantwort auslöst.
4. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 1 oder 2,
das bzw. dessen Abbauprodukte durch MHC-Moleküle
15 präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort
auslösen.
5. Immunogenes Peptid nach Anspruch 4, ausgewählt aus
der Gruppe von Peptiden gemäß SEQ ID NO:22 bis 55.
6. Immunogenes (Poly)peptid nach einem der Ansprüche
20 1 bis 5 für die Immuntherapie von
Krebserkrankungen *in vivo* oder *ex vivo*, wobei das
(Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen
des Patienten induziert, die B99 exprimieren.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung für die
25 parenterale, topische, orale oder lokale
Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie als
wirksame Komponente ein oder mehrere immunogene

(Poly)peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.

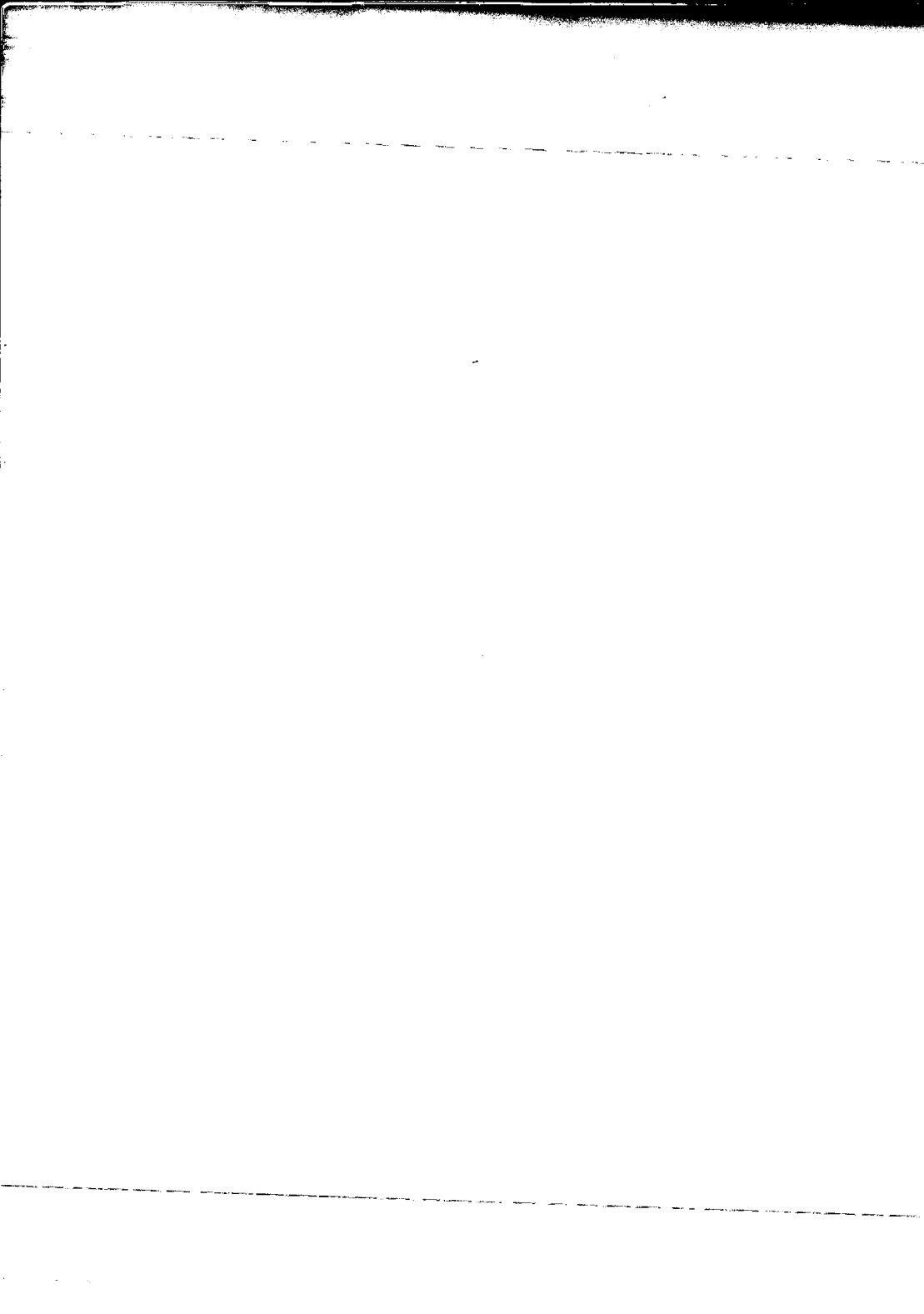
- 5 8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie verschiedene von B99 abgeleitete immunogene Peptide enthält.
- 10 9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere von B99 abgeleitete Peptide in Mischung mit von anderen tumorassoziierten Antigenen abgeleiteten Peptiden enthält.
- 15 10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide an mindestens zwei verschiedene HLA-Typen binden.
- 15 11. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften eines in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigens oder für Fragmente davon.
- 20 12. DNA-Molekül nach Anspruch 12, kodierend für ein immunogenes Polypeptid der Bezeichnung B99 mit der in SEQ ID NO:2, 4 oder 6 dargestellten Aminosäuresequenz bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide.
- 25 13. DNA-Molekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO:1, 3 oder 5 dargestellten Sequenz ist oder mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO:1, 3 oder 5 dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

210
207

14. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13.
15. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 11 bis 14, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen, wobei
5 das von dem DNA-Molekül exprimierte B99-(Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen des Patienten induziert, die B99 exprimieren.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als wirksamen Bestandteil ein oder mehrere der in
10 einem der Ansprüche 11 bis 15 definierten DNA-Moleküle.
17. Verwendung von Zellen, die das in Anspruch 1 definierte tumorassoziierte Antigen exprimieren, für die Herstellung einer Krebsvakzine.
- 15 18. Antikörper gegen ein in einem der Ansprüche 1 bis 5 definiertes (Poly)peptid.
19. Antikörper nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
- 20 20. Antikörper nach Anspruch 18 oder 19 für die Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen, die mit der Expression von B99 assoziiert sind.

Zusammenfassung

Tumorassoziiertes Antigen, davon abgeleitete immunogene
5 Peptide und dafür kodierende DNA-Moleküle sowie deren
Verwendung in der Immuntherapie von Krebserkrankungen



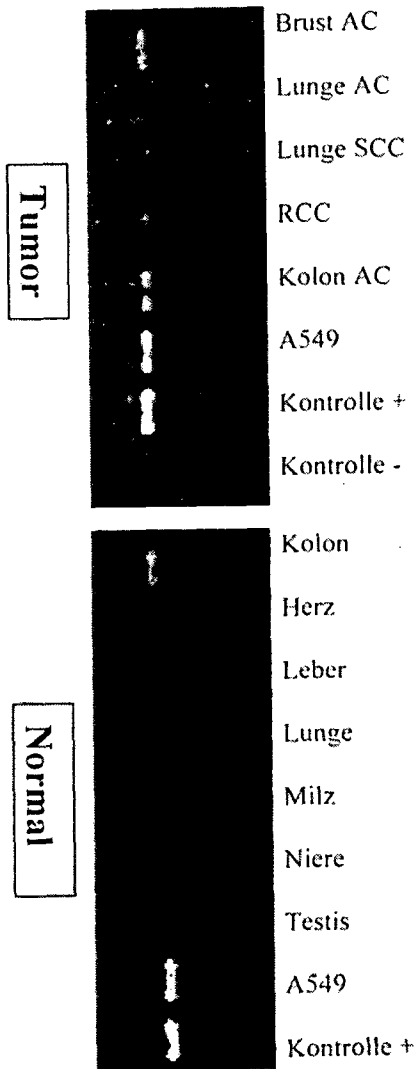


Fig. 1

2/2/2009

Pankreas normal

Pankreas normal

Pankreas normal

Pankreas Tumor

Pankreas Tumor

Pankreas Tumor

A549

Kontrolle -

Marker

Kolon AC

Kolon AC

Kolon AC

Kolon AC

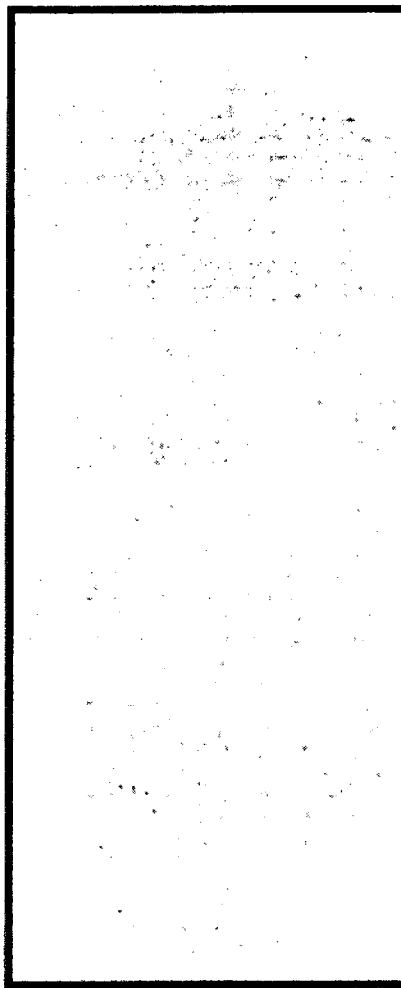
Kolon normal

Kolon normal

Kolon normal

Fig. 2

27/2/10



-7.5
-4.4
-2.4
-1.35

PBL
Kolon
Dünndarm
Ovar
Testis
Prostata
Thymus
Milz
Pankreas
Niere
Muskel
Leber
Lunge
Plazenta
Gehirn
Herz

kb

Fig. 3

~~27~~

211

REPÚBLICA FEDERAL ALEMANA

25



Certificación

Boehringer Ingelheim International GmbH en Ingelheim/Alemania, ha presentado en la Oficina de Patentes y Marcas Alemana el 28 de Abril de 1999 una solicitud de Patente de Invención con el título:

"Antígeno asociado con tumores"

Los documentos anejos son reproducción fiel y exacta de los originales de esta solicitud de Patente.

A la solicitud le ha asignado temporalmente la Oficina de Patentes y Marcas Alemana el símbolo A 61 K 39/00 de la Clasificación Internacional de Patentes.

München, 12 de Abril de 2000

El Presidente de la
Oficina de Patentes y Marcas Alemana
Por Autorización

Fdo.: Agurks

Nº de Expediente: 199 19 225.1

216 213

Caso 12/203 DI Fa/dc

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

55216 Ingelheim am Rhein (D)

Título: Antígeno asociado con tumores

217

El invento se refiere a la inmunoterapia de enfermedades de tumores.

El sistema inmunitario tiene la misión de proteger al organismo con respecto de un gran número de diferentes microorganismos o la de combatir activamente a éstos. La importancia de un sistema inmunitario intacto se muestra sobre todo en el caso de inmunodeficiencias heredadas o adquiridas. El empleo de programas profilácticos de vacunación se manifestó en muchos casos como una intervención inmunológica extremadamente conducente a su finalidad y con éxito en la lucha contra enfermedades infecciosas víricas o bacterianas. Además, se ha mostrado que el sistema inmunitario participa decisivamente también en la eliminación de células de tumores. En tal caso, desempeña un papel esencial el reconocimiento de los antígenos asociados con tumores (TAAs, de *TumorAssoziierten Antigene*) por componentes del sistema inmunitario. En el sentido más amplio, cada componente (peptídico o no peptídico) de una célula tumoral, que se reconoce por un elemento del sistema inmunitario y conduce a la estimulación de una respuesta inmunológica, puede funcionar como antígeno tumoral inmunógeno. Les corresponde importancia especial en tal caso a los antígenos de tumores que no solamente provocan una reacción inmunológica sino que producen también un rechazo del tumor. La identificación de antígenos definidos, que pueden producir tal reacción inmunológica, constituye una etapa importante para el desarrollo de una vacuna molecularmente definida contra tumores. Aún cuando todavía no se ha puesto en claro totalmente qué elementos del sistema inmunitario son responsables de un rechazo del tumor, existe sin embargo un consenso acerca de que en este contexto desempeñan un papel especial los linfocitos T citotóxicos (CTLs, de *Cytotoxic T Lymphocytes*), que expresan CD8 (Coulie, 1997). Especialmente en el caso de las especies de tumores (p.ej. melanoma

215

y carcinoma renal), que tienen una tasa de remisión espontánea relativamente alta, se pudo comprobar una correlación entre la evolución clínica y la aparición aumentada de células T CD8⁺ y CD4⁺ (Schendel y colaboradores, 1993; Mackensen y colaboradores, 1993; Halliday y colaboradores, 1995; Kawakami y colaboradores, 1995; Kawakami y colaboradores, 1996; Wang, 1997; Celluzzi y Falo, 1998). En tal caso se obtuvieron clones de CTL específicos o bien a partir de linfocitos que se infiltran en tumores (TIL, de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) o células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC, de *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) después de cultivación conjunta con células de tumores, que la mayor parte de las veces son autólogas, y de estimulación *in vitro* de las citoquinas. Tanto en modelos de animales como también en sistemas de cultivos celulares humanos cultivados *in vitro* se pudo reforzar la respuesta de las células T frente a células de tumores por transfección de las células de tumores con citoquinas (van Elsas y colaboradores, 1997; Gansbacher y colaboradores, 1990; Tepper y colaboradores, 1989; Fearon y colaboradores, 1990; Dranoff y colaboradores, 1993).

Por causa de la correlación entre la remisión y la participación de células T CD8⁺, la identificación de antígenos asociados con tumores (TAA), que son reconocidos por CTLs positivos para CD8, constituye una meta principal declarada en el camino para el desarrollo de una vacuna contra tumores (Pardoll, 1998; Robbins y Kawakami, 1996). Todavía no está claro si también desempeñan un papel esencial otros tipos de células del sistema inmunitario, tales como p.ej. células T cooperantes CD4⁺; algunos estudios con péptidos MAGE-3/HLA-A1 en pacientes de melanoma indican que esto es así (Marchand y colaboradores, 1995; Boon y colaboradores, 1998). En los últimos años transcurridos, se ha identificado una serie de TAAs, que son reconocidos por los CTLs (Boon y colaboradores, 1994; van den Eynde y van der Bruggen, 1997).

Las células T reconocen a antígenos como fragmentos

219 216

peptídicos, que son presentados junto a superficies celulares de moléculas del MHC ("major histocompatibility complex" = complejo de histocompatibilidad principal) en seres humanos, "HLA" = "human leukocyte antigen" = antígeno de leucocitos humanos). Hay dos clases de moléculas de MHC: las moléculas del MHC-I aparecen en la mayor parte de las células con núcleo y presentan péptidos (usualmente 8 - 10-meros), que se forman mediante descomposición proteolítica de proteínas endógenas (el denominado tratamiento de antígenos, "antigen processing"). Los complejos de péptidos y del MHC-I son reconocidos por CTLs positivos para CD8. Las moléculas del MHC-II aparecen sólo en las denominadas "células presentadoras de antígenos profesionales" (APC = "antigen presenting cells") y presentan péptidos de proteínas exógenas, que en el transcurso de la endocitosis son recogidas y tratadas por las APC. Los complejos de péptidos y del MHC-II son reconocidos por células T cooperantes de CD4. Mediante una interacción entre un receptor de células T y el complejo de un péptido y del MHC se pueden provocar diferentes mecanismos efectores, que en el caso de los CTLs conducen a la apoptosis de la célula diana. Esto sucede cuando se reconoce como ajeno o bien el MHC (p.ej. en el caso del rechazo de un trasplante), o del péptido (p.ej. en el caso de patógenos intracelulares). No obstante, no todos los péptidos presentados cumplen los requisitos estructurales y funcionales para una interacción efectiva con células T (tal como ha sido descrito por Rammensee y colaboradores, 1995 y más adelante en esta memoria).

Para el empleo de TAAs en una vacuna contra tumores, son posibles fundamentalmente varias formas de aplicación: El antígeno puede ser aplicado o bien como proteína recombinante con apropiados adyuvantes o sistemas de soporte, o como ADNc que codifica el antígeno en vectores de plásmidos (vacunas de ADN; Tighe y colaboradores, 1998) o víricos (Restifo, 1997). Otra posibilidad consiste en el empleo de bacterias recombinantes (p.ej. *Listeria*, *Salmonella*), que expresan recombinantemente el antígeno humano y mediante sus

22P 217

componentes adicionales tienen un efecto adyuvante (Pater-
son, 1996; Pardoll, 1998). En todos estos casos, se necesi-
tan un tratamiento y una presentación del antígeno por las
denominadas "células presentadoras de antígenos profesiona-
5 les" (APC). Otra posibilidad es el empleo de péptidos
sintéticos (Melief y colaboradores, 1996), que corresponden
a los epítomos para células T correspondientes al antígeno
y que o bien se cargan desde el exterior en las APC (Buschle
y colaboradores, 1997; Schmidt y colaboradores, 1997) o se
10 recogen por las APC y se transfieren intracelularmente a las
moléculas del MHC-I. La forma de aplicación más eficiente
terapéuticamente para un antígeno definido es determinada
por lo general en estudios clínicos.

Entre los antígenos o sus epítomos, reconocidos por
15 los CTLs específicos para tumores, se cuentan moléculas que
pueden proceder de todas las clases de proteínas (p.ej.
factores de transcripción, receptores, enzimas; para una
visión de conjunto, véase Rammensee y colaboradores, 1995;
Robbins y Kawakami, 1996). Estas proteínas no deben estar
20 necesariamente localizadas junto a la superficie de las
células, tal como se necesita esto en el caso del reconoci-
miento por anticuerpos. Con el fin de funcionar para el
reconocimiento por los CTLs como antígeno específico para
tumores y con el fin de poderse emplear para la terapia, las
25 proteínas deben cumplir determinadas condiciones; en primer
lugar, el antígeno debe de ser expresado principalmente por
células de tumores y en los denominados tejidos normales
"críticos" no debe aparecer o sólo debe aparecer en una
concentración menor que en tumores. Los tejidos normales
30 críticos son tejidos esenciales; una reacción inmunitaria
dirigida contra ellos podría tener en ciertas circunstancias
secuelas graves, en parte letales. En segundo lugar, el
antígeno no solamente debe estar presente en el tumor
primario, sino también en las metástasis. Además, en lo que
35 respecta a una aplicación clínica amplia del antígeno, ha de
pretenderse que éste se encuentre presente en alta concen-
tración en varias especies de tumores. Otra condición previa

22 218

para la idoneidad de un TAA como constituyente eficaz de una vacuna es la presencia de epítomos para células T en la secuencia de aminoácidos del antígeno; los péptidos derivados de un TAA deben conducir a una respuesta de células T *in vitro/in vivo* (péptido "inmunógeno"). Otro criterio de selección adicional para un péptido inmunógeno ampliamente aplicable a escala clínica es la frecuencia con la que el antígeno ha de encontrarse en una población dada de pacientes.

10 Los antígenos asociados con tumores (TAAs) inmunógenos, de los cuales ya se mostró en su mayor parte que poseen epítomos para células T, se pueden clasificar en varias categorías, entre otras, proteínas víricas, proteínas mutadas, proteínas sobreexpresadas, proteínas de fusión
15 formadas por translocación cromosomal, antígenos de diferenciación, antígenos oncofetales (Van den Eynde y Brichard, 1995; van den Eynde y van der Bruggen, 1997).

Los métodos para la identificación y la caracterización de TAAs, que constituyen el punto de partida para el
20 desarrollo de una vacuna contra tumores se basan por un lado en el empleo de CTLs (respuesta inmunitaria celular) o de anticuerpos (respuesta inmunitaria humoral) ya inducidos en los pacientes, o se basan en la elaboración de perfiles diferenciales de transcripción entre tumores y tejidos
25 normales. En el primero de los casos, es decir el punto de partida inmunológico, se emplean CTLs de pacientes para un escrutinio de bibliotecas de expresión de ADNc de tumores eucarióticos, que presentan los epítomos para CTL a través de moléculas del MHC-I (Boon y colaboradores, 1994),
30 mientras que por medio de antisueros muy afines de pacientes se investigan bibliotecas de expresión de ADNc procarióticos, directamente a través de un análisis por inmunotransferencia de las calvas individuales en cuanto a la presencia de los TAAs (Sahin y colaboradores, 1995). Una combinación
35 entre la reactividad de los CTL y un procedimiento químico proteínico la constituye el aislamiento de péptidos aislados a partir del MHC-I de células de tumores, que se habían

seleccionado previamente a través de la reactividad con CTLs de pacientes. Los péptidos son separados por lavado con respecto del complejo de MHC-I e identificados con ayuda de la espectrometría de masas (Falk y colaboradores, 1991; 5 Woelfel y colaboradores, 1994; Cox y colaboradores, 1994). Los puntos de partida, que utilizan CTLs para la caracterización de antígenos, están vinculados con un considerable gasto o no siempre tienen éxito, por causa de la cultivación y la activación necesarias de los CTLs.

10 Los métodos para la identificación de TAAs, que se basan en la comparación del perfil de transcripción de un tejido normal con el de un tejido tumoral, son múltiples y muy variados; entre ellos se cuentan la hibridación diferencial, el establecimiento de bancos de ADNc por substracción 15 ("representational difference analysis" (análisis de la diferencia representativa); Hubank y Schatz, 1994; Diatchenko y colaboradores, 1996) y el empleo de la tecnología de los chip de ADN o del método de SAGE (Velculescu y colaboradores, 1995). Al contrario que en el método inmunológico 20 antes mencionado con ayuda de los CTLs de pacientes, en el caso de emplearse métodos de biología molecular debe de mostrarse que los candidatos a antígenos potenciales, encontrados de esta manera, son específicos para tumores (están asociados a tumores) y poseen realmente epítomos para 25 células T, que pueden provocar una respuesta citotóxica de células T. En por lo menos uno de los casos (NY-ESO/LAGE-1) se identificó un antígeno tanto mediante la utilización de sueros de pacientes como también mediante un análisis RDA (Chen y colaboradores, 1997; Lethe y colaboradores, 1998), 30 además se describieron epítomos para CTL de este antígeno y unas simultáneas respuestas humoral espontánea y de células T en un paciente (Jager y colaboradores, 1998).

Fue misión del presente invento poner a disposición un nuevo antígeno asociado con tumores (TAA).

35 El problema planteado por esta misión se resolvió produciendo primeramente una biblioteca por substracción de ADNc mediante un RDA ("representational difference analysis"

= análisis diferencial representativo) entre una línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549) y un tejido de pulmón normal. Para la selección de los antígenos sobreexpresados en el tumor, se secuenciaron a continuación los clones obtenidos de ADNc y se compararon con las secuencias disponibles en bancos de datos. Entre los genes anotados en tal caso se encontraban 321 desconocidos, entre las cuales existían en el banco de datos en su mayor parte incorporaciones de ESTs ("expressed sequence tags" = marcas de secuencias expresadas). De acuerdo con otro análisis cualitativo adicional por PCR en bibliotecas de ADNc de tejidos normales críticos y tejidos inmunitariamente privilegiados así como en investigaciones más detalladas de bancos de datos, el número de los clones candidatos se limitó a 56, cuyas ESTs no proceden de tejidos normales críticos. Mediante una RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction = reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa) se comprobó que tres de los 56 clones investigados manifiestan una expresión principalmente en diferentes tejidos de tumores y ninguna o sólo una escasa expresión en tejidos normales. La comparación cualitativa (mediante PCR) de la expresión de uno de los clones (B99) entre un tejido normal y un tejido de tumor mostró una sobreexpresión del ADNc de B99 en diferentes tumores. El perfil de expresión analizado mediante una transferencia Northern (Northern Blot) mostró complementariamente que el B99 no presentaba en los tejidos normales investigados ninguna transcripción o presentaba solamente una débil transcripción.

El ADNc de B99 humano fue clonado, la secuencia obtenida se representa en SEQ ID NO:1. El análisis de la secuencia del ADNc de B99 humano clonado puso de manifiesto que desde la posición 427 hasta la posición 1.743 se presenta un cuadro de lectura abierto continuo, que, en el plano de los nucleótidos y las proteínas, posee una alta identidad con el cuadro de lectura abierto de la beta-1,3-galactosil-o-glicosil-glicoproteína beta-1,6-n-acetil-

glucosaminil-transferasa. A partir de los datos obtenidos a partir de experimentos por transferencias Northern ha de sacarse la conclusión de que el transcrito de B99 tiene una longitud de aproximadamente 3,0 kb. La región clonada del ADNc de B99 tiene un tamaño de 2.216 pb (pares de bases), respondiendo la presencia de una cola de poli A en el extremo 3' de la secuencia de la compleción del ADNc en esta región. La diferencia en cuanto al tamaño del ADNc clonados de B99, en comparación con el tamaño deducible del análisis por transferencia Northern, se puede explicar por la presencia de una cola de poli A con longitud desconocida así como de una secuencia adicional en la región no traducida en 5' de B99. Por causa del hecho de que en la región de 5' del ADNc clonado no se presenta ningún cuadro de lectura continuo desde la posición 0 a 427, se puede sacar la conclusión de que en el caso del ATG en posición 427 se trata del codón de iniciación de B99.

Una información adicional acerca de la secuencia situada más corriente arriba de B99 se puede obtener por métodos clásicos de biología molecular, p.ej. mediante 5'-RACE ("*rapid amplification of cDNA ends*" = amplificación rápida de extremos de ADNc). En el caso de este método, se transcribe inversamente un ARN, preferiblemente un ARNm (mensajero), procedente de células o tejidos en los que es transcrito el B99 (p.ej. tejido de carcinoma de colon o líneas celulares derivadas de adenocarcinoma pulmonar, tales como A549) y a continuación se liga con un adaptador con secuencia conocida. Una PCR con un cebador de adaptador (que se fija específicamente al adaptador situado en el extremo 5' del ADNc) y un cebador específico para B99 (p.ej. SEQ ID NO:8, 10, 11) permite la amplificación de correspondientes fragmentos de B99. Estos fragmentos de PCR, tal como se describe en el Ejemplo 1, pueden ser clonados según métodos clásicos y caracterizados, especialmente por secuenciación de ADN.

Un método alternativo para la caracterización del extremo 5' es el escrutinio de bibliotecas de ADNc por

225 222

hibridación con sondas de ADN o antisueros, que son específicos para B99.

Si el escrutinio de bibliotecas de ADNc por causa de limitaciones condicionadas por la metodología, p.ej. 5
condicionado por una transcripción inversa ineficiente, debido a estructuras secundarias pronunciadas del ARN, no conduce a la meta deseada, se pueden investigar bibliotecas genómicas mediante el recurso de que p.ej., tal como en el caso del escrutinio de bibliotecas de ADNc, mediante 10
hibridación con sondas de ADN específicas para B99, se pueden aislar clones que contienen la información obtenida de secuencia corriente arriba del extremo 5' del ADNc, p.ej. la región de promotor de B99.

El ADNc aislado codifica el antígeno asociado con 15
tumores (TAA) que tiene la denominación B99 con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 (B99-1). La secuencia de B99-1 es definida por el codón de iniciación en la posición 427 del ADNc de B99 aislado.

En un experimento adicional para la clonación de la 20
región codificadora de B99, en la que se utilizó el ADNc procedente de la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón, se determinó una secuencia, que en comparación con la secuencia representada en SEQ ID NO:1 presenta una inserción de un nucleótido en posición 923 (SEQ ID NO:3 o 25
SEQ ID NO:5). Esta inserción conduce a una modificación del cuadro de lectura abierto de B99 con una secuencia de aminoácidos modificada resultante de ello en la región terminal de C de la proteína B99; la secuencia de este antígeno de B99 (B99-2), que se deduce de este cuadro de 30
lectura, está representada en SEQ ID NO:4. Además de la inserción, el ADNc aislado a partir de células A549 presenta un intercambio de nucleótidos en la posición 622 en comparación con la secuencia SEQ ID NO:1. Este intercambio de nucleótidos da lugar en la posición N° 66 un reemplazo de 35
arginina (SEQ ID NO:2, B99-1) por triptófano (SEQ ID NO:4, B99-2). Aparte de este intercambio de aminoácidos, la secuencia de aminoácidos de B99-2 hasta la posición 166

226223

inclusive es idéntica a la de B99-1.

La inserción de un nucleótido en la posición 923 proporciona un segundo cuadro de lectura potencial desde la posición 845 hasta la 1.744 de la secuencia representada en SEQ ID NO:3 (o en SEQ ID NO:5). Una proteína expresada por un ADNc con este cuadro de lectura tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:6 (B99-3). La secuencia de B99-3 es diferente desde la posición 1 a la 27 de la de B99-1 y a partir de la posición 28 es idéntica a la de B99-1.

El invento concierne por consiguiente en un primer aspecto a un antígeno asociado con tumores que tiene la denominación B99, seleccionado entre el grupo de polipéptidos con las secuencias de aminoácidos que se indican en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6.

Las secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID NO:2 (B99-1), SEQ ID NO:4 (B99-2) y SEQ ID NO:6 (B99-3) pueden tener desviaciones, p.ej. las que están condicionadas por el intercambio de aminoácidos, siempre y cuando que el derivado de B99 tenga las propiedades inmunógenas deseadas para la utilización en una vacuna contra tumores. (Un ejemplo acerca de un polimorfismo de B-99 de este tipo es la diferencia condicionada por mutación puntual en la posición 66 entre B99-1 y B99-2.

En lo sucesivo, cuando no se indique otra cosa distinta, la denominación "B99" se utiliza representativamente para B99-1, B99-2 y B99-3.

La secuencia natural de aminoácidos de B99 (o correspondientemente las secuencias del ADNc de B99) puede ser eventualmente modificada, intercambiando aminoácidos individuales en un epítipo para CTL de B99, con el fin de producir, en comparación con el epítipo natural para CTL de B99, producir un aumento de la afinidad de los péptidos de B99 para moléculas del MHC-I y con ello una inmunogenicidad y finalmente una reactividad aumentada frente a tumores. Las modificaciones en la región de los epítopos para B99 pueden ser llevadas a cabo en la proteína total de B99 (ésta es

224 224

tratada por las APCs para dar los correspondientes péptidos) o en fragmentos proteínicos mayores de B99 o en péptidos de B99 (compárese más adelante).

En un aspecto adicional, el presente invento concierne a fragmentos y péptidos inmunógenos, que se derivan de B99. Estos últimos son denominados en lo sucesivo como "péptidos de B99". Un primer grupo lo constituyen los péptidos de B99, que provocan una respuesta inmunitaria humoral (inducción de anticuerpos). Tales péptidos son segmentos seleccionados de B99 (por lo menos de 12 a 15 aminoácidos), que se pueden determinar mediante los denominados algoritmos de predicción ("prediction algorithms") tal como p.ej. el "surface probability blot" (borrón de probabilidad superficial) (Emini y colaboradores, 1985), el "hydrophobicity blot" (borrón de hidrofobia) (Kyte y Doolittle, 1982) y el "antigenic index" (índice antigénico) (Jameson y Wolf, 1988).

Al efectuar la elección de candidatos a péptidos de B99 merecen interés especial las regiones de B99-2 y B99-3, que se diferencian de las de B99-1. Con la premisa de que en el caso de la inserción del ADN de B99, que conduce a estas diferencias en la secuencia de aminoácidos, se trata de una mutación específica para tumores, hay que esperar en efecto que los péptidos procedentes de esta región presenten una inmunogenicidad aumentada en comparación con la de los péptidos procedentes de B99-1. Con el fin de confirmar que la inserción es específica para tumores, se pueden generar anticuerpos contra esta región e investigar células de tumores en cuanto a la expresión de B99-2 y B99-3.

Los péptidos de B99 son administrados directamente o en una forma modificada (p.ej. acoplada a KLH = "keyhole limpet hemocyanine" = hemocianina de lapa de bocallave) y se determina la formación de anticuerpos mediante análisis inmunológicos corrientes, p.ej. mediante un ELISA.

Otros péptidos de B99, preferidos dentro del marco del presente invento, son aquellos que son presentados por moléculas del MHC y producen una respuesta inmunitaria

228 225

celular. Existen dos clases de moléculas del MHC, a saber moléculas del MHC-I, que son reconocidas por CTLs positivos para CD8, y moléculas del MHC-II que son reconocidas por células T cooperantes positivas para CD4.

5 Para que un péptido provoque una respuesta inmunitaria celular, éste debe de fijarse a una molécula del MHC, debiendo el paciente que ha de ser tratado tener la molécula del MHC en su repertorio. La determinación del subtipo del MHC del paciente constituye por consiguiente, en lo referen-
10 te a la provocación de una respuesta inmunitaria celular, una de las condiciones previas esenciales para la utilización eficaz de un péptido en este paciente.

La secuencia de un péptido B99, que se ha de emplear terapéuticamente, es preestablecida por la respectiva
15 molécula de MHC en lo referente a los aminoácidos de anclaje y su longitud. Posiciones de anclaje y longitudes definidas garantizan que un péptido se adapte dentro del surco de fijación de péptidos de la respectiva molécula del MHC del paciente. Esto tiene como consecuencia el hecho de que sea
20 estimulado el sistema inmunitario y se produzca una reacción inmunitaria celular, que en el caso de la utilización de un péptido derivado de un antígeno tumoral se dirija contra las células de tumores del paciente.

Los péptidos de B99 inmunógenos se pueden identificar
25 de acuerdo con métodos conocidos, uno de los fundamentos para ello es la relación entre la fijación al MHC y la inducción de los CTL.

Puesto que por lo tanto la secuencia de péptidos inmunógenos es determinable de antemano en virtud de su
30 motivo de fijación peptídico, se pueden identificar y sintetizar péptidos de B99, que constituyen epítomos para CTL, en base a la secuencia proteínica de B99. Para ello son apropiados diferentes métodos que se utilizaron para la identificación de epítomos para CTL de antígenos de proteínas que se conocen; p.ej. el método descrito por Stauss y
35 colaboradores, 1992, para la identificación de epítomos para células T en el virus de papiloma humano.

Los requisitos específicos para un alelo de cada producto de alelo del MHC-I a un péptido, que se fija a la molécula del MHC y es presentado por ésta, fueron recopilados como motivo (p.ej. Falk y colaboradores, 1991). Hasta
5 ahora se conoce un gran número tanto de motivos de péptidos del MHC como también de ligandos del MHC. Un método apropiado dentro del marco del presente invento para la búsqueda de epítomos para una proteína conocida, que se adapta dentro de una determinada molécula del MHC-I, fue descrito en un
10 artículo recopilativo de Rammensee y colaboradores, 1995. Éste abarca las siguientes etapas: en primer lugar se investiga la secuencia de proteínas en cuanto a segmentos que correspondan al motivo de anclaje, siendo posibles determinadas variaciones en lo referente a la longitud del
15 péptido y a la ocupación del anclaje. Cuando p.ej. un motivo prescribe un 9-mero con Ile o Leu en el extremo, se pueden tomar en consideración también 10-meros con un extremo terminal de C correspondiente, y asimismo péptidos con otros restos alifáticos tales como Val o Met en el extremo
20 terminal de C. De este modo se obtienen una serie de candidatos a péptidos. Estos son investigados en cuanto a la presencia del mayor número posible de restos de anclaje, que ellos tengan en común con ligandos ya conocidos y/o para determinar si tienen restos "preferidos" para diferentes
25 moléculas del MHC (correspondientemente a la Tabla de Rammensee y colaboradores, 1995). Con el fin de excluir a los péptidos que se fijan débilmente, se llevan a cabo convenientemente análisis de fijación. Cuando se conocen los requisitos en cuanto a la fijación a péptidos para determi-
30 nadas moléculas del MHC, los candidatos a péptidos se pueden investigar también en cuanto a restos que no sean de anclaje, que repercutan negativa o positivamente sobre la fijación, o que hagan posible ésta por primera vez (Ruppert y colaboradores, 1993). En el caso de este modo de proceder
35 hay que tomar en consideración, sin embargo, que el motivo de fijación del péptido no solamente es decisivo para la búsqueda en cuanto a ligandos naturales; también otros

220 227

aspectos, p.ej. la especificidad para enzimas durante el tratamiento del antígeno, contribuyen a la identidad del ligando - adicionalmente a la especificidad de la fijación al MHC. Un método, que toma en consideración estos aspectos y que es apropiado dentro del marco del presente invento para la identificación de péptidos de B99 inmunógenos, fue utilizado, entre otros autores, por Kawakami y colaboradores, 1995, a fin de identificar epítomos para gp100 basándose en motivos conocidos de HLA-A*0201.

Los péptidos se pueden seleccionar también en lo referente a su capacidad para fijarse a moléculas del MHC-II. El motivo de fijación al MHC-II, que se extiende a lo largo de nueve aminoácidos, presenta un grado de degeneración en las posiciones de anclaje mayor que el motivo de fijación al MHC-I. Se desarrollaron hace poco tiempo, partiendo del análisis estructural por rayos X de moléculas del MHC-II, métodos que permiten el análisis exacto de los motivos de fijación al MHC-II y partiendo de ello permiten variaciones de la secuencia de péptidos (Rammensee y colaboradores, 1995, y la bibliografía original allí citada). Los péptidos, que se fijan a moléculas del MHC-II, son presentados a las células T de CD4 típicamente por células dendríticas, macrófagos o células B. Las células T de CD4 a su vez activan entonces a continuación de ello directamente los CTLs, mediante p.ej. segregación y amplificación de citoquinas, la eficiencia de la presentación de antígenos por las APC (células dendríticas, macrófagos y células B).

Desde hace poco tiempo están a disposición bancos de datos y algoritmos de predicción, que permiten con gran seguridad la predicción de epítomos para péptidos, que se fijan a una determinada molécula del MHC.

Dentro del marco del presente invento se identificaron, mediando utilización del algoritmo descrito por Parker y colaboradores, 1994, y Rammensee y colaboradores, 1995, péptidos candidatos a los más importantes tipos de HLA, especialmente a los HLA-A1, -A*0201, -A3, -B7, -B14 y -

B*4403, de los que se puede esperar que se fijen a las correspondientes moléculas de HLA y por lo tanto constituyan epítomos para CTL inmunógenos; los péptidos determinados se enumeran en la Tabla 2. De manera similar, eventualmente
5 mediando utilización de otros algoritmos, que toman en consideración las diversas características de los péptidos (hidrofobia, carga, tamaño) o los requisitos en cuando a los péptidos, p.ej. la estructura tridimensional de la molécula de HLA, se pueden determinar otros epítomos potenciales para
10 péptidos; esto es válido también para los epítomos para péptidos de otros tipos de HLA.

Después de la elección de candidatos a péptidos de B99 con ayuda de los métodos señalados, se ensaya su fijación al MHC mediante análisis de fijación a péptidos. Como siguiente
15 etapa se determina la inmunogenicidad de los péptidos con buenas propiedades de fijación (la estabilidad de la interacción entre péptidos y el MHC se correlaciona en la mayor parte de los casos con la inmunogenicidad; van der Burg y colaboradores, 1996). Con el fin de determinar la
20 inmunogenicidad del péptido o equivalente a péptido que se selecciona, se pueden utilizar métodos, tales como p.ej. el descrito por Sette y colaboradores, 1994, en combinación con análisis cuantitativos de fijación al MHC. Alternativamente, la inmunogenicidad del péptido seleccionado se puede ensayar
25 a través de inducción *in vitro* de CTL mediante métodos conocidos (tal como se describen más adelante en esta memoria para la inducción *ex vivo* de CTL). El principio del método realizado en varias etapas para la elección de péptidos que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria celular, está descrito en el documento de solicitud de
30 patente PCT WO 97/30721, a cuya divulgación se hace referencia expresamente por la presente. Una estrategia general para la obtención de péptidos inmunógenos eficientes, que es apropiada dentro del marco del presente invento, fue descrita además por Schweighoffer, 1997.
35

En lugar de utilizar los péptidos originales, que se adaptan dentro del surco de fijación de moléculas del MHC-I

o MHC-II, es decir péptidos, que se derivan inalteradamente de B99, con ayuda de los requisitos mínimos en lo referente a las posiciones de anclaje y a la longitud, que se indican sobre la base de la secuencia original del péptido, se pueden llevar a cabo variaciones, siempre y cuando que mediante estas variaciones no sólo no se perjudique, sino que se refuerce preferiblemente, la inmunogenicidad efectiva del péptido, que se compone de su afinidad para la fijación a la molécula del MHC y su capacidad para estimular receptores de células T. En este caso se utilizan por lo tanto péptidos artificiales o equivalentes a tales péptidos, que se han desarrollado correspondientemente a los requisitos de la capacidad de fijación a una molécula de MHC.

Los péptidos modificados de tal manera son designados como "péptidos heteroclíticos". Éstos se pueden obtener de acuerdo con los siguientes métodos:

En primer lugar se desarrollan los epítomos para ligandos del MHC-I o MHC-II o la variación de éstos, p.ej. de acuerdo con el principio descrito por Rammensee y colaboradores, 1995. La longitud del péptido corresponde, en el caso de su sintonización a moléculas del MHC-I, preferiblemente a una secuencia mínima de 8 a 10 aminoácidos con los necesarios aminoácidos de anclaje.

Eventualmente, el péptido puede también ser prolongado en los extremos terminales de C y/o de N, siempre y cuando que esta prolongación no perjudique la capacidad de fijación a la molécula del MHC o que el péptido prolongado pueda ser tratado celularmente en cuanto a la secuencia mínima.

Los péptidos modificados son comprobados después de ello en cuanto a su reconocimiento por TILs ("*tumor-infiltrating lymphocytes*" = linfocitos que se infiltran en tumores), en cuanto a inducción de CTL así como en cuanto a fijación al MHC e inmunogenicidad aumentadas, tal como ha sido descrito por Parkhurst y colaboradores, 1996, y por Becker y colaboradores, 1997.

Otro método apropiado dentro del marco del presente invento para el hallazgo de péptidos con inmunogenicidad más

fuerte que la de los péptidos de B99 naturales, consiste en el escrutinio de bibliotecas de péptidos con CTLs, que reconocen a los péptidos de B99, que se presentan por naturaleza en tumores, tal como ha sido descrito por Blake y colaboradores, 1996; en este contexto se propone la
5 utilización de bibliotecas combinatorias de péptidos, con el fin de desarrollar moléculas, que imiten a los epítomos para tumores reconocidos por CTLs restringidos por el MHC-I.

Los polipéptidos de B99 del presente invento o los
10 fragmentos o péptidos inmunógenos derivados de ellos, se pueden producir por vía recombinante o mediante síntesis de péptidos, tal como se ha descrito en el documento WO 96/10413, a cuya divulgación se hace referencia por la presente. Para la preparación por vía recombinante, la
15 correspondiente molécula de ADN se introduce de acuerdo con métodos clásicos en un vector de expresión, se transfecta en una apropiada célula hospedante, la célula hospedante se cultiva en condiciones apropiadas de expresión y la proteína se purifica. Para la síntesis química de péptidos de B99, se
20 pueden utilizar métodos habituales, p.ej. usando un sintetizador automático de péptidos adquirible en el comercio.

Alternativamente a los péptidos de B99 naturales o a los péptidos heteroclíticos, se pueden utilizar sustancias que simulen a tales péptidos, p.ej. "miméticos de péptidos"
25 o "péptidos retro-inversos". Para el ensayo de estas moléculas en lo referente a la utilizabilidad terapéutica en una vacuna contra tumores, se aplican los mismos métodos que anteriormente para los péptidos naturales B99 o los equivalentes a tales péptidos de B99.

El TAA con la denominación B99 de acuerdo con el
30 presente invento y los fragmentos de proteínas, péptidos o equivalentes a péptidos o bien miméticos de péptidos que se derivan de ellos, se pueden emplear en la terapia de los cánceres, p.ej. con el fin de inducir una respuesta inmunitaria frente a células de tumores, que expresan los correspondientes determinantes de antígenos. Preferiblemente, son
35 utilizados para la terapia de tumores positivos para B99,

especialmente en los casos de carcinomas de células renales, pulmón, colon y estómago.

La respuesta inmunitaria en forma de una inducción de CTLs puede ser producida *in vivo* o *ex vivo*.

5 Para la inducción *in vivo* de CTLs se administra una composición farmacéutica, que como componente activo contiene el B99 de TAA o fragmentos o péptidos derivados de ellos, a un paciente que sufre de una enfermedad de tumor asociada con el TAA, debiendo la cantidad de TAA (péptido) ser suficiente para conseguir una respuesta eficaz de CTL al tumor que es portador de los antígenos.

10 El invento concierne por consiguiente en otro aspecto adicional a una composición farmacéutica para la administración por vía parenteral, tópica, oral o local. Preferiblemente, la composición sirve para la administración por vía parenteral, p.ej. para la aplicación por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular. Los TAAs/ péptidos de B99 son disueltos o suspendidos en un soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. La composición
15 puede contener además de ello sustancias coadyuvantes usuales, tales como tampones, etc. Los TAAs/ péptidos se pueden utilizar a solas o en combinación con adyuvantes, p.ej. el adyuvante incompleto de Freund, saponinas, sales de aluminio o, en una forma preferida de ejecución, policatib-
20 nes, tales como poliarginina o polilisina. Los péptidos se pueden fijar también a componentes, que ayuden a la inducción de CTL o a la activación de CTL, p.ej. a péptidos T cooperantes, lípidos o liposomas, o se administran en común con estas sustancias y/o en común con sustancias estimulado-
25 ras de la inmunidad, p.ej. citoquinas (IL-2, IFN- γ). Métodos y formulaciones, que se adecuan para la preparación y administración de la composición farmacéutica conforme al invento, se describen en los documentos WO 95/04542 y WO
30 97/30721, a cuya divulgación se hace referencia por la presente.
35 presente.

Los B99 (fragmentos) o péptidos de B99 se pueden utilizar también para provocar *ex vivo* una respuesta de CTL.

Una respuesta ex vivo de CTL a un tumor, que expresa B99, es inducida incubando las células precursoras de CTL conjuntamente con APCs y péptidos de B99 o la proteína de B99. Luego se deja que los CTLs activados se expandan, después de lo
5 cual son administrados de nuevo al paciente. Alternativamente, se pueden cargar las APCs con péptidos de B99, lo cual puede conducir a una activación eficiente de reacciones inmunitarias celulares contra tumores positivos para B99 (Mayordomo y colaboradores, 1995; Zitvogel y colaboradores,
10 1996). Un método apropiado para cargar péptidos en células p.ej. células dendríticas, es divulgado en el documento WO 97/19169.

En una forma de ejecución del invento, se utiliza una combinación de varios diferentes péptidos de B99 o equivalentes a péptidos de B99. En una forma adicional de realización se combinan péptidos de B99 con péptidos que se derivan de otros TAAs. La elección de péptidos para tales combinaciones se efectúa en atención a la clasificación de diferentes tipos de MHC, para cubrir una población lo más amplia
15 que sea posible de pacientes y/o se adapta a un espectro de indicaciones lo más amplio que sea posible, combinando péptidos de varios diferentes antígenos de tumores. El número de los péptidos en una composición farmacéutica puede fluctuar a lo largo de un amplio margen, típicamente
20 contiene una vacuna aplicable químicamente de 1 a 15, preferiblemente de 3 a 10 diferentes péptidos.

Los péptidos conformes al invento se pueden emplear también como reactivos para el diagnóstico. Por ejemplo, los péptidos se pueden utilizar para ensayar la reacción de un
30 paciente a la respuesta inmunitaria humoral o celular provocada por el péptido inmunógeno. Con ello existe la posibilidad de mejorar un protocolo de tratamiento. Por ejemplo, dependiendo de la forma de presentación (péptido, proteína total o vacuna de ADN) del TAA se puede investigar
35 el aumento de células T precursoras en los PBLs, que presentan una reactividad contra el epítipo definido para péptido (Robbins y Kawakami, 1996, así como las referencias

citadas allí). Además, los péptidos o la proteína total o los anticuerpos dirigidos contra el TAA se pueden utilizar para predecir el riesgo de enfermar de un paciente de un tumor asociado a B99 o bien para caracterizar la evolución de la enfermedad de un tumor positivo para B99 (p.ej. mediante análisis inmuno-histoquímicos de tumores primarios y metástasis). Una estrategia de este tipo ya se ha manifestado como satisfactoria múltiples veces, p.ej. la detección de receptores de estrógenos como fundamento de decisión para la endocrino-terapia en el caso de un cáncer de mama; de *erbB-2* como marcador relevante en el caso del pronóstico y la evolución de la terapia en el caso de un cáncer de mama (Ravaioli y colaboradores, 1998; Revillion y colaboradores, 1998); PSMA ("*prostate specific membrane antigen*" = antígeno membranal específico para próstata) como marcador para células epiteliales del carcinoma de próstata en el suero o mediante empleo de un anticuerpo monoclonal contra PSMA marcado con ^{111}In en el caso de la inmuno-escintigrafía en cuanto a carcinoma de próstata (Murphy y colaboradores, 1998 y referencias incluidas); de CEA ("*carcinoembryonic antigen*" = antígeno carcino-embriónico) como marcador serológico para el pronóstico y la evolución en el caso de un paciente del carcinoma colorrectal (Jessup y Loda, 1998).

El presente invento concierne en otro aspecto a moléculas aisladas de ADN, que codifican una proteína con las propiedades inmunógenas de B99 o fragmentos de ésta.

En un aspecto, el presente invento concierne a una molécula aislada de ADN que contiene un polinucleótido con la secuencia representada en SEQ ID NO:1 o que contiene un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido con la secuencia representada en SEQ ID NO:1.

En un aspecto adicional, el presente invento concierne a una molécula aislada de ADN, que contiene un polinucleótido con la secuencia representada en SEQ ID NO:3 (o bien SEQ ID NO: 5) o que contiene un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la

secuencia representada en SEQ ID NO:3 (o bien SEQ ID NO:5).

Las moléculas de ADN conformes al invento o fragmentos de ellas codifican (poli)péptidos con la denominación B99 (B99-1, B99-2 ó B99-3) con la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 o fragmentos de proteínas o péptidos que se derivan de ella; con ello se abarcan al mismo tiempo moléculas de ADN que por causa de la degeneración del código genético presentan desviaciones con respecto de la secuencia representada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o bien SEQ ID NO:5.

El invento se refiere también a moléculas de ADN, que presentan desviaciones condicionadas por un intercambio conservativo de aminoácidos con respecto a la secuencia representada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 (o bien SEQ ID NO:5) siempre y cuando que éstas codifiquen un derivado de B99 o fragmentos o péptidos con las propiedades inmunógenas que son deseadas para la aplicación como vacuna contra tumores.

En lo sucesivo, las moléculas de ADN que codifican B99-1, B99-2 o B99-3 o fragmentos de éstos, eventualmente modificadas, que antes se han definido, se designan como "moléculas de ADN de B99", cuando no se indique otra cosa distinta.

Las moléculas de ADN de B99 del presente invento o los correspondientes ARNs, que también constituyen objeto del presente invento, se emplean, al igual que los (poli)péptidos codificados por ellos, para la inmunoterapia de enfermedades de cáncer.

En una forma de realización del invento, se utilizan moléculas de ADN que codifican polipéptidos de B99 naturales. Alternativamente al ADNc de B99 natural o fragmentos de éste, se pueden utilizar derivados modificados. Estos comprenden secuencias con modificaciones que codifican una proteína (o fragmento) o péptidos con más fuerte inmunogenicidad, siendo válidas para las modificaciones en el plano del ADN las mismas consideraciones que para los péptidos que antes se han descrito. Otro modo de la modificación es la

agrupación yuxtapuesta de numerosas secuencias, que codifican péptidos inmunológicamente relevantes, a modo de una sarta de perlas ("*string-of-beads*"; Toes y colaboradores, 1997). Las secuencias pueden ser modificadas también por adosamiento de elementos auxiliares, p.ej. funciones que garantizan una entrega y un tratamiento más eficientes del inmunógeno (Wu y colaboradores, 1995). Por ejemplo, mediante adición de una secuencia de localización en el retículo endoplasmático ("*ER targeting sequence*") se pueden aumentar el tratamiento y por consiguiente la presentación y a fin de cuentas la inmunogenicidad del antígeno.

El presente invento concierne en otro aspecto a una molécula de ADN recombinante, que contiene el ADN de B99.

Las moléculas de ADN de B99 del presente invento, se pueden administrar, preferiblemente en forma recombinante como plásmidos, directamente o como constituyente de un virus, o una bacteria, recombinante. En principio, se puede aplicar cualquier método terapéutico génico para la inmunoterapia de un cáncer a base de un ADN ("*vacuna de ADN*") para el ADN de B99, y concretamente tanto *in vivo* como también *ex vivo*.

Ejemplos para la administración *in vivo* son la inyección directa de ADN "desnudo", o bien por vía intramuscular o mediante una pistola de genes ("*gene gun*") de la que se ha mostrado que conduce a la formación de CTLs contra antígenos de tumores. Ejemplos de organismos recombinantes son virus de Vaccinia, adenovirus o *Listeria monocitogenes* (una vista de conjunto fue dada por Coulie en 1997). Además, se pueden utilizar soportes sintéticos para ácidos nucleicos, tales como lípidos catiónicos, microesferas, microbolitas o liposomas para la administración *in vivo* de moléculas de ácidos nucleicos, que codifican un péptido B99. Similarmente a como para los péptidos, se pueden administrar conjuntamente diferentes sustancias coadyuvantes que refuercen la respuesta inmunitaria, p.ej. citoquinas, o bien en forma de proteínas o de plásmidos que las codifican. La aplicación puede ser combinada eventualmente con métodos

físicos, p.ej. electroporación.

Un ejemplo de la administración ex vivo es la transfección de células dendríticas, tal como ha sido descrito por Tuting, 1997, u otras APCs, que pasan a aplicarse como
5 vacuna celular contra el cáncer.

El presente invento concierne por consiguiente en otro aspecto a la utilización de células, que expresan B99, o bien de por sí mismas o en forma eventualmente modificada, después de transfección con la secuencia correspondientemente
10 te codificadora, para la preparación de una vacuna contra el cáncer.

El invento concierne en un aspecto adicional a anticuerpos contra B99 o fragmentos de ellos. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener de un modo habitual por
15 inmunización de animales, especialmente conejos, mediante inyección del antígeno o fragmentos de ellos, y posterior purificación de la inmunoglobulina.

Los anticuerpos anti-B99 monoclonales se pueden obtener de acuerdo con protocolos clásicos, según el
20 principio descrito por Köhler y Milstein, 1975, inmunizando a animales, especialmente a ratones, a continuación inmortalizando células productoras de anticuerpos de los animales inmunizados, p.ej. por fusión con células de mieloma, y escrutando el material sobrenadante de los hibridomas
25 obtenidos mediante análisis clásicos inmunológicos en cuanto a anticuerpos anti-B99 monoclonales. Para el empleo terapéutico o diagnóstico en seres humanos, estos anticuerpos animales pueden ser quimerizados (Neuberger y colaboradores, 1984, Boulianne y colaboradores, 1984) o humanizados
30 (Riechmann y colaboradores, 1988, Graziano y colaboradores, 1995) eventualmente de un modo habitual.

Los anticuerpos anti-B99 monoclonales humanos pueden ser obtenidos también por las denominadas "bibliotecas de presentación de fagos" = "*Phage Display Libraries*" (Winter
35 y colaboradores, 1994, Griffiths y colaboradores, 1994, Kruif y colaboradores 1995, Mc Guinness y colaboradores, 1996) y mediante animales transgénicos (Brüggemann y

colaboradores, 1996, Jakobovits y colaboradores, 1995).

Los anticuerpos anti-B99 conformes al invento se pueden emplear en análisis inmuno-histoquímicos para finalidades de diagnóstico.

5 En un aspecto adicional, el invento concierne a la utilización de anticuerpos específicos para B99, a fin de llevar selectivamente a cualesquiera sustancias deseadas junto a o dentro de un tumor, que expresa B99. Ejemplos de tales sustancias son agentes citotóxicos o núclidos radiac-
10 tivos, cuyo efecto consiste en dañar al tumor en sus cercanías. Por causa de la expresión de B99 específica para un tumor, no son de esperar en tales casos efectos colaterales de ningún tipo o sólo escasos efectos colaterales. En un aspecto adicional, con ayuda de anticuerpos para B99 se
15 pueden aprovechar para la visibilización de tumores sustancias que expresan B99. Esto es útil para el diagnóstico y para la valoración de la evolución de la terapia. Aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de anticuerpos, que entran en cuestión para anticuerpos anti-B99, están descritas en el
20 documento WO 95/33771.

El TAA con la denominación de B99 de acuerdo con el presente invento y los fragmentos de proteínas, péptidos o equivalentes a péptidos o miméticos de péptidos que se derivan de ellos, se pueden emplear en la terapia del
25 cáncer, p.ej. con el fin de inducir una respuesta inmunitaria contra células de tumores, que expresan los correspondientes determinantes de antígenos. Preferiblemente, son utilizados para la terapia de tumores positivos para B99, especialmente en los casos de carcinomas de células renales, pulmón, colon, páncreas y estómago.
30

Recopilación de las Figuras:

- Figura 1: Análisis por RT-PCR de conjuntos de ADNc de diferentes tejidos de tumores y normales humanos mediante cebadores específicos para B99
35
- Figura 2: Análisis por RT-PCR de ADNc's individuales de diferentes tejidos de tumores y normales humanos

mediante cebadores específicos para B99

Figura 3: Transcripción de B99 en tejidos normales: Análisis por transferencia Northern de los ARNm procedentes de 16 tejidos normales

5

Ejemplo 1

RDA (análisis diferencial representativo) de la línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón (A549) y de
10 tejido normal de pulmón

La línea celular A549 (CCL 185) de adenocarcinoma de pulmón humano, adquirida de la ATCC se cultivó en frascos para cultivo celular T150. Como medio nutricio sirvió un MEM (medio esencial mínimo) con suero de ternero fetal, desactivado por calor, al 10% y L-glutamina 2 mM. Cada 3 a 4 días
15 las células fueron disociadas mediante tripsinación en 1:5 hasta 1:10 para propagación. Después de haberse alcanzado una confluencia de aproximadamente 80% se emplearon para cosechar las células por cada frasco de cultivo celular T150
20 4 ml de una solución de tripsina (datos por cada litro: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,13 g de Na_2HPO_4 anhidro, 0,2 g de KH_2PO_4 , 100 ml de una solución al 2,5% de tripsina, 1 g de la sal de Na de EDTA; pH 7,2-7,4) para cosechar las células. Los 4 ml se transfirieron a un tubito Falcon de 15 ml de
25 capacidad, se mezclaron con 8 ml de PBS, se centrifugaron a 1.200 rpm en una centrífuga de mesa sde Haereus (Megafuge 2,0R) durante 5 min a 4°C, el sedimento celular se mezcló con 1 ml de tampón para lisis (Tris·HCl 10 mM de pH 8, NaCl 140 mM, MgCl_2 1,5 mM, NP40 al 0,5%), se agitó enérgicamente
30 y se separó por centrifugación en un recipiente de Eppendorf de 2 ml de capacidad a 12.000 rpm y 4°C durante 5 min en una centrífuga de mesa Sigma (Sigma 202 MK). El material sobrenadante fue transferido a un nuevo recipiente de Eppendorf y después de haber añadido 55 μl de una solución
35 al 20% de SDS se extrajo dos veces con el volumen doble de una mezcla de CHCl_3 y fenol (1:1 v/v) y una vez con el volumen simple de CHCl_3 . La fase acuosa que contenía ARN se

mezcló con 1/10 volúmenes de NaAc 3 M (de pH 5) y el volumen
doble de EtOH al 96% y se precipitó el ARN durante una noche
a -20°C. Partiendo de 1 mg de ARN total se procedió de un
modo correspondiente al protocolo del fabricante para
5 realizar el aislamiento de poli-A(+) ARN mediante el estuche
PolyATtract Kit (Promega). El almacenamiento del poli-A(+) ARN
de A549 con una concentración de 1 mg/ml en H₂O tratada
con DEPC se efectuó en partes alícuotas a -80°C.

Para la realización del análisis diferencial represen-
10 tativo (RDA; Hubank y Schatz, 1994; Diatchenko y colaboradores,
1996) se empleó el poli-A(+) ARN de la línea celular de
adenocarcinoma de pulmón A549 como "tester" (ensayador) y el
de un tejido normal de pulmón (1 mg/ml; Clontech, Palo Alto;
N° 6524-1) como "driver" (conductor). El RDA se llevó a cabo
15 correspondientemente al protocolo del fabricante mediante
utilización del estuche PCR-select® kit (Clontech, Palo
Alto), con la excepción de que pasó a emplearse un sistema
modificado de cebador y adaptador de 2 oligonucleótidos con
la siguiente secuencia:

20 5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTACCGAGCTCGAG-3'
(Adaptor-2-alt-1; SEQ ID NO:19),
5'-AGGGCGTGGTACCGAGCTCGAG-3' (nested-PCR-primer-2-alt; SEQ
ID NO:20) y 5'-GGCTCGAGCTC-3' (Adaptor-2-alt-2; SEQ ID
NO:21). Las secuencias de cebador y adaptador generadas de
25 nuevas hacen posible mediante la presencia de tres nuevos
sitios de corte con enzimas de restricción (Kpn I, Sac I y
Xho I) en la secuencia del nested-PCR-primer-2-alt después
de clonación de los fragmentos de ADNc substraídos en el
vector de pPCRII, un posterior recorte de los respectivos
30 fragmentos de ADNc. El diseño de una secuencia de cebador y
adaptador con varios sitios de corte con enzimas de restric-
ción disponibles era por lo tanto necesario, puesto que con
frecuencia se podían observar mutaciones puntuales en las
secuencias de cebadores - condicionado por las etapas de
35 amplificación por PCR -.

Después de la síntesis del ADNc bicatenario mediante
oligo-dT, el ADNc obtenido de ensayador y conductor se

digirió con RsaI (el RsaI es una enzima de restricción reconocedora de 4 bases y proporciona fragmentos de ADNc que tienen en un promedio estadístico una longitud de 256 pb). Partes iguales de "ADNc de ensayador" fueron ligadas con los adaptadores 1 ó 2 y a continuación separadas e hibridadas con un exceso de "ADNc de conductor" a 65°C. Después de ello, ambas tandas fueron reunidas y sometidas a una segunda hibridación con "ADNc de conductor" desnaturalizado recientemente obtenido. Los ADNcs específicos para "ensayador" y enriquecidos fueron a continuación amplificados exponencialmente mediante PCR con cebadores específicos para los adaptadores 1 ó 2 respectivamente. Para un enriquecimiento adicional, una parte alícuota de esta reacción se sometió a una segunda PCR con cebadores específicos desplazados hacia el interior ("nested"). Los fragmentos de ADNc amplificados exponencialmente, que resultan de esta reacción, fueron ligados directamente en el vector pCRII (Invitrogen; "TA-cloning vector" = vector de clonación de TA) y a continuación un tercio de la tanda de ligación se transfectó en *E. coli* competentes (OneShot®, Invitrogen).

Se obtuvieron 712 Transformantes positivos (selección entre azul y blanco) y se cultivaron en bloques de 96 pocillos en un medio LB-Amp (1,3 ml por cada pocillo) durante 48 h a 37°C. Por cada pocillo se emplearon 750 µl de las suspensiones de *E. coli* para la preparación del ADN de plásmido (método de minipreparación de 96 pocillos de QIAgen de acuerdo con la prescripción del fabricante). Los cultivos de bacterias remanentes se almacenaron como cultivos de reserva en glicerol a -80°C.

Se obtuvo una biblioteca por substracción de ADNc que constaba de 712 clones individuales, que se presentaba tanto en forma de cultivos de reserva de *E. coli* en glicerol como también en forma de plásmidos purificados.

Ejemplo 2

Secuenciación y anotación de ADN candidatos a TAA

El ADN de plásmido aislado de todos los 712 clones

244 291

(véase el Ejemplo 1) fue secuenciado de acuerdo con el método de Sanger en un aparato ABI-Prism. Las secuencias obtenidas fueron anotadas mediante el programa lógico BioScout-Software (LION, Heidelberg) y se sometieron a comparaciones en el banco de datos (Genbank). De 712 clones pudieron ser secuenciados y anotados 678. El resto (34) o bien tenía como inserto sólo secuencias de poli(A) o correspondía a un vector renovadamente ligado o no era secuenciable. De las 678 secuencias anotables se manifestaron 357 como genes con función conocida. Los restantes 321 representan a clones que codifican genes con función desconocida; 59 de ellos no tenían incorporaciones algunas en el banco de datos EST humano. Los genes conocidos no fueron tratados ulteriormente. Para cada uno de los genes desconocidos, para los que estaba disponible una incorporación en EST, se llevó a cabo una estimación del perfil de expresión; en tal caso se comprobaron todos aquellos ESTs que tenían una identidad >95% (BLAST), que pertenecían a la secuencia correspondientemente determinada por vía experimental de las bibliotecas por substracción. Al realizar la anotación se llevó a cabo una clasificación en i) tejido normal crítico, ii) tejido fetal "prescindible" e inmunitariamente privilegiado y iii) tumores y líneas celulares de tumores. Sobre la base de este "perfil virtual de ARNm" se seleccionaron 200 clones, para los que no se encontraron ESTs algunos en el grupo i), para realizar otros análisis experimentales adicionales (inclusive los 59 clones, para los que no se presentaba ninguna incorporación en EST). Para estrechar adicionalmente los clones candidatos, se desarrollaron y sintetizaron pares de cebadores de oligonucleótidos a partir de las secuencias determinadas por los 200 clones seleccionados. En primer lugar se ensayaron 8 diferentes bibliotecas de ADNc derivadas de tejido humano (GibcoBRL "SUPER-SCRIPT®") que están clonadas direccionalmente en pCMV-SPORT, mediante una PCR cualitativa en cuanto a la presencia de los respectivos candidatos. Las bibliotecas de ADNc empleadas en tal caso procedían de tejidos de corazón

242

(N° 10419-018), hígado (N° 10422-012), leucocitos (N° 10421-022), riñón (N° 10420-016), pulmón (N° 10424-018), testículos (N° 10426-013), cerebro (N° 10418-010) y cerebro fetal (N° 10662-013).

5 Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 20 μ l de volumen total por cada tanda de PCR contenían 1x de tampón TaqPol (KCl 50 mM, Tris·HCl 10 mM, de pH 9, Triton X-100 al 0,1%), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM (Promega), polimerasa de ADN-Taq 0,025 U/ml (Promega), en cada caso 5 pM de
10 específicos cebadores de oligonucleótidos SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, y 100 ng del ADN de plásmido que en cada caso se ha de investigar. Para el testigo se emplearon cebadores específicos para GAPDH (SEQ ID NO:14 y 15). Para la comprobación de la detección selectiva, los pares de cebadores se
15 ensayaron paralelamente también en cuanto al plásmido aislado. La detectabilidad de fragmentos con la longitud que es de esperar en uno de los tejidos normales críticos (de corazón, hígado, pulmón, riñón y leucocitos), pero no en las bibliotecas de ADNc procedentes de tejidos inmunitariamente
20 privilegiados (de cerebro, cerebro fetal y testículos) en estas condiciones de la PCR (1 ciclo: 3' a 94°C; 35 ciclos: 1' a 94°C - 1' a 55°C - 1' a 72°C; 1 ciclo: 7' a 72°C) se definió como criterio de separación. Mediante este análisis cuantitativo por PCR se pudo estrechar a 56 el número de los
25 candidatos.

Ejemplo 3

Análisis por transcripción de los clones candidatos en diferentes tejidos de tumores y normales

30 Para el análisis por RT-PCR se utilizaron conjuntos de ADNc que se habían preparado en cada caso a partir de 3 μ g de ARN total de 3 diferentes tejidos del mismo tipo. Los 9 μ g de ARN total por cada conjunto de tejido procedente de tejidos de tumor o normales se transcribieron inversamente
35 mediante AMV-RT (Promega) correspondiendo a las recomendaciones del fabricante. Con el fin de evitar contaminaciones con ADN genómico, el ARN fue incubado previamente con DNase

I (Boehringer Mannheim). La calidad y la cantidad de los ADNc's se comprobó mediante una PCR con cebadores específicos para GAPDH (SEQ ID NO:14 y 15) después de 20 ciclos (30" a 95°C, 90" a 60°C). El ADNc de B99 fue amplificado mediante 25, 30 y 35 ciclos del programa consistente en: 1' a 95°C, 1' a 55°C, 1' a 72°C con los cebadores específicos para B99 conforme a SEQ ID NO:7 y 8. Análogamente, los otros 55 clones candidatos fueron investigados con los cebadores en cada caso específicos. Los productos de la PCR fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa y coloración con bromuro de etidio. Para 3 de los 56 clones investigados se pudo demostrar una expresión aumentada en diferentes tejidos de tumores en comparación con tejidos normales. Un ejemplo de un candidato a B99 está mostrado en la Figura 1: El análisis por RT-PCR de conjuntos de ADNc de diferentes tejidos de tumores y normales humanos mediante cebadores específicos para B99, proporcionó una fuerte señal en el carcinoma de colon y en la línea de adenocarcinoma de pulmón A549, así como una débil señal en el carcinoma de mama y el carcinoma de células de riñón. De todos los tejidos normales investigados se podía comprobar una débil señal sólo en un tejido de colon. En la evolución ulterior el candidato a B99 fue evaluado con mayor exactitud.

25 Ejemplo 4

Perfil de expresión de B99 en tejidos de tumores y normales

Uno de los 56 candidatos (denominación: B99) mostró una señal mediante transcripción por RT-PCR en 3 de 5 conjuntos ensayados de tejidos de tumores. En la mayor parte de los tejidos normales ensayados no se pudo comprobar por el contrario ninguna transcripción.

Para una investigación detallada de B99 se analizaron mediante PCR en lo que sigue los ADNc's de muestras individuales de tejidos de tumores y normales. En tal caso se puso de manifiesto que la mayor parte de todos los carcinomas de colon (17 de 23), de todos los carcinomas de páncreas (3 de 3) y de todos los carcinomas de estómago (4 de 4) expresan

247 244

B99. En correspondientes tejidos normales se comprobó una expresión en 1 de 4, 0 de 3 y respectivamente 2 de 4 casos. Todos los resultados están recopilados en la Tabla 1, la Figura 2 muestra resultados ilustrativos para tejidos de páncreas y de colon: mediante análisis por RT-PCR de ADNc's individuales de diferentes tejidos de tumores y normales humanos mediante cebadores específicos para B99 se pudo comprobar un ADNc de B99 en 6 de 7 muestras de tumores, mientras que solamente uno de los tejidos normales investigados (1 de 6) mostraba una débil expresión de B99.

228 245

Tabla 1:

Tejido de tumor		Tejido normal		
Tipo	Casos positivos/ casos ensayados	Tipo	Casos positivos/ casos ensayados	
5	Carcinoma de colon	17/23	Colon	1/4
	Carcinoma de hígado	0/3	Hígado	0/4
	Carcinoma de pulmón	2/9	Pulmón	0/4
	Carcinoma de mama	0/10	n.d.	
	Carcinoma de páncreas	3/3	Páncreas	0/4
10	Carcinoma de células renales	1/10	Riñón	0/4
	Carcinoma de estómago	4/4	Estómago	2/4
			Linfocitos	0/1
15			Intestino delgado	1/1
			Ovario	0/1
			Testículos	0/4
			Próstata	0/1
			Timo	0/1
			Bazo	0/4
			Músculo	0/1
20			Cerebro	0/1
			Corazón	0/4

25 Para el análisis por transferencia Northern se
hibridaron durante 16 h a 65°C borrones de transferencia
Northern de tejidos múltiples humanos (Clontech, Palo Alto)
con el producto de la PCR de B99 de 271 pb marcado con [α -
32p] dCTP (NEN, Boston). La visualización se efectuó
30 mediante autorradiografía patrón (Xomat AR film, Kodak) y
exposición en un fosfovisualizador [Phosphoimager] (de
Molecular Dynamics). La Figura 3 muestra el resultado de
este análisis de 16 tejidos normales. En tales casos se
manifestó solamente en el colon y de modo claramente más

219 246

débil en el duodeno un transcrito con un tamaño de ~3,0 kb. La pequeña intensidad de la señal permite aparecer como improbable sin embargo una expresión inmunológicamente relevante.

5 Los resultados de todos los experimentos en lo referente al perfil de ARNm de B99 (compilados a partir de análisis por RT-PCR y por transferencia Northern) están recopilados en la Tabla 1. El Ejemplo 4 muestra que el B99 es transcrito claramente en un alto porcentaje de tumores de
10 diferentes indicaciones, mientras que en todos los tejidos normales investigados no se encontró ninguna transcripción o se encontró solamente una transcripción aislada.

Ejemplo 5

15 Clonación de B99

El clon B99 posee entre los adaptadores introducidos mediante el RDA un inserto con una longitud de 271 pb de un gen humano desconocido. Para la clonación completa de la secuencia humana se procedió de la siguiente manera: un
20 análisis de UniGene (Centro Nacional para Información de Biotecnología = *National Center for Biotechnology Information*) proporcionó los siguientes ESTs homólogos para B99: AA315469, AA345780, AA295520. Con ayuda de estos ESTs se pudo prolongar la secuencia de B99 a 439 nucleótidos. Se
25 sintetizaron nuevos cebadores dentro de esta secuencia (SEQ ID NO:9 hasta 12). Mediante PCR con diferentes combinaciones de estos cebadores, se pudieron amplificar las respectivas longitudes teóricas de fragmentos a partir del ADNc de A549.

Clonación del extremo de 3': 10 µg del ARN total
30 procedente de la línea celular 786-0 de carcinoma de células renales se transcribieron inversamente mediante un cebador de oligo-dT, y una parte alícuota de este ADNc se sometió a una PCR, cuyo programa comienza con altas temperaturas de reanillamiento (annealing) de modo que solamente el cebador
35 específico para genes se fija al ADNc (cebador SEQ ID NO:7 ó 9 respectivamente), mientras que el segundo cebador ($T_m \sim 53^\circ\text{C}$, SEQ ID NO:13) se fija primeramente a una tempera-

250 247

tura más baja a la carga previa de ADN sintetizada de nuevas. Esta denominada "touch-down PCR" = PCR de toque (Mastercycler Gradient, Eppendorf) se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 20 ciclos {15" a 95°C, 30" a 75°C
5 (reducido en 0,7°C por cada ciclo)}, 1 ciclo durante 7' a 72°C así como 20 ciclos (15" a 95°C, 30" a 50°C) 1 ciclo durante 7' a 72°C}.

Una parte alícuota de la tanda anterior se amplificó de nuevo por PCR mediante una segunda combinación de
10 cebadores (SEQ ID NO:7 y 13 o respectivamente SEQ ID NO:12 y 13) en las mismas condiciones que precedentemente. Partes alícuotas de las tandas para PCR se ligaron directamente en el vector pGEM-T easy (Promega) y a continuación se transformaron en *E. coli* J109 competentes (Promega). Los clones
15 positivos se secuenciaron después de selección por PCR. La secuenciación proporcionó una coincidencia con la secuencia actual a partir del cebador utilizado para la amplificación por PCR y además de ello 1.777 nucleótidos adicionales hasta el comienzo de una secuencia de poliA en la región de 3' de
20 la secuencia. La amplificación por PCR de ADNc procedente de líneas celulares de tumores (786-0, A549) así como muestras de tejidos de carcinomas de colon con los cebadores según las SEQ ID NO:16 hasta 18 proporcionaron con los cebadores originales los fragmentos que se esperaban después de la
25 clonación. En el fragmento de ADNc que ahora constaba de 2.216 pb se pudo identificar un cuadro de lectura continuo desde la posición 427 hasta la 1.743. Además, en la región 5' de la secuencia no se pudieron identificar cuadros de lectura adicionales de ningún tipo, de lo cual se puede
30 sacar la conclusión de que la región de 0 a 427 pertenece ya a la región no traducida en 3' del ARNm de B99.

Con ayuda de los cebadores SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:17 se amplificó, clonó y secuenció la región codificadora total de B99 procedente de ADNc de A549. Al realizar la
35 secuenciación se obtuvieron varios clones con una inserción de un nucleótido en la posición 923 en comparación con SEQ ID NO:1 (que codifica B99-1) (véanse SEQ ID NO:3 y respecti-

251 248

vamente SEQ ID NO:5).

Esta inserción conduce a una modificación del cuadro de lectura abierto de B99 con una secuencia modificada de aminoácidos resultante de ello en la región terminal de C de la proteína de B99; la secuencia del antígeno de B99 (B99-2) derivada de este cuadro de lectura está representada en SEQ ID NO:4.

Uno de los clones aislados a partir de células A549 mostró, junto con la inserción mencionada, un intercambio de nucleótidos en la posición 622 en comparación con la secuencia de SEQ ID NO:1. Este intercambio de nucleótidos condiciona en la posición N° 66 de la secuencia de aminoácidos un reemplazo de arginina (SEQ ID NO:2, B99-1) por triptófano (SEQ ID NO:4, B99-2). Dejando aparte este intercambio de aminoácidos, la secuencia de aminoácidos de B99-2 hasta la posición 166 es idéntica a la de B99-1.

Además de ello, la inserción mencionada condiciona un segundo cuadro de lectura potencial desde la posición 845 hasta la 1.744 de la secuencia representada en SEQ ID NO:3 (o en SEQ ID NO:5). Una proteína expresada por un ADNc que tiene este cuadro de lectura presenta la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:6 (B99-3). La secuencia de B99-3 es diferente a la de B99-1 desde la posición 1 a la 27 e idéntica a B99-1 a partir de la posición 28.

Ejemplo 6

Péptidos potenciales de fijación al MHC en la región codificadora de B99

Epítomos potenciales para péptidos dentro de la región codificadora de B99-1 según SEQ ID NO:2 (posiciones de aminoácidos: 1-438; Tabla 2A), la de B99-2 según SEQ ID NO:4 (posiciones de aminoácidos 150-190; Tabla 2B) y la de B99-3 según SEQ ID NO:6 (posiciones de aminoácidos 1-40; Tabla 2C) se realizaron mediante los algoritmos descritos por Parker y colaboradores, 1994, tomando como base motivos conocidos (Rammensee y colaboradores, 1995). Para los más importantes

tipos de HLA, especialmente para los HLA-A1, -A*0201, -A3, -B7, -B14 y -B*4403, se identificaron péptidos candidatos 9-
meros, de los cuales es de esperar que se fijen a las correspondientes moléculas de HLA y por lo tanto constituyan
5 epítomos para CTL inmunógenos; los péptidos determinados están enumerados en la Tabla 2. Mediante un modo análogo de proceder se pueden determinar otros potenciales epítomos para péptidos para otros tipos de HLA u otros péptidos 8- y 10-meros.

253 250

Tabla 2A

Candidatos a péptidos de B99 inmunógenos (B99-1)

	Posición inicial en SEQ ID NO:2	Secuencia	HLA
5	5	Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu	B14
	12	Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met	A*0201
10	85	Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys	A3
	90	Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe	A3
	95	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr	B*4403
	96	Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu	B7
	123	Pro Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Phe	A3
15	127	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr	B*4403
	147	Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala	B14
	187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	A*0201
	206	Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu	A*0201
	251	Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys	A1, A3
20	275	Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys	A3
	305	Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys	A3

~~254~~ 251

5

318	Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr	A1
400	Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu	A*0201
407	Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys	A3
413	Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu	B7
422	Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr	A1
423	Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys	A1, A3

252

Tabla 2B

Candidatos a péptidos de B99 inmunógenos (B99-2)

5	Posición inicial en SEQ ID NO:4		
	152	Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr	A1, A3
	154	Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr Cys Val	A*0201
10	160	Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val	A*0201
	163	His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn	A1
	164	Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe	A1, B*4403
	172	Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr	A1
	177	Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys	A1
15	182	Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln	A*0201

256 253

Tabla 2C

Candidatos a péptidos de B99 inmunógenos (B99-3)

5	Posición inicial en SEQ ID NO:6		
	2	Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr	A1, B14
	5	Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu	A*0201
10	10	Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg	A1
	12	Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr	A1, A3
	14	Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val	A*0201
	16	Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met	A*0201

15

Bibliografía

257 254

Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga, J., y
5 Knop, J. (1997), J. Immunol. Methods 203, 171-180.

Blake, J., Johnston, J.V., Hellström, K.E., Marquardt, H., y,
Chen, L. (1996), J. Exp. Med. 184, 121-130.

10 Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der
Bruggen, y A. Van Pel (1994), Annu.Rev.Immunol. 12: 337-365

Boon T, (1998). Tumor antigens recognized by cytolytic
T cells. Cancer Vaccine Week - Interantional Symposium, New
15 York, Oct 1998; abstract S01

Boulianne, G. L., et al., (1984), Nature 312: 643-646

Brüggemann, M. y Neuberger, M.S., (1996), Immunol. Today 17:
20 391-397

Buschle M, Schmidt W, Zauner W, Mechtler K, Trska B, Kirlappos
H, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:3256-
3261

25 Celluzzi, CM y Falo, LD, Jr. (1998), J. Immunol. 160: 3081-
3085

Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O.,
30 Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., y
Old, L.J. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94,
1914-1918.

Coulie, P.G. (1997), Mol. Med. Today 3: 261-268
35

238 255

Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow, TL,
Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, y Slingluff, CL, Jr.
(1994), Science 264: 716-719

5 Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A.,
Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya,
N., Sverdlov, E.D., y Siebert, P.D. (1996), Proc. Natl. Acad.
Sci. U. S. A. 93, 6025-6030.

10 Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky,
H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., y
Mulligan, R. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90:
3539-3543.

15 Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, y Boger, J (1985), J. Virol.
55: 836-839

Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., y
Rammensee, H-G (1991), Nature 351: 290-296.

20

Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P.,
Levitsky, H.I., Simons, J.W., Karasuyama, H., Vogelstein, B.,
y Frost, P. (1990), Cell 60: 397-403.

25 Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K., Bannerji,
R., y Gilboa, E. (1990), J. Exp. Med. 172: 1217-1224.

Graziano, R.F., et al., (1995), J. Immunol. 155: 4996-5002

30 Griffiths, A.D., et al., (1994), EMBO J. 13: 3245-3260

Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, y Barnetson RS
(1995), World J. Surg. 19: 352-358

35 Hubank, M. y Schatz, D.G., (1994), Nucleic. Acids. Res. 22,

5640-5648.

Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J.,
Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y.,
5 Stockert, E., Old, L.J., y Knuth, A. (1998), J. Exp. Med. 187,
265-270.

Jakobovits, A., (1995), Curr. Opin. Biotechnol. 6: 561-566

10 Jameson, BA y Wolf, H (1988) The antigenic index: a novel
algorithm for predicting antigenic determinants. Comput. Appl.
Biosci. 4: 181-186

Jessup, JM y Loda, M (1998) Prognostic markers in rectal
15 carcinoma. Semin. Surg. Oncol. 15: 131-140.

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., King,
X., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Appella, E., y
Rosenberg, S.A. (1995), J. Immunol. 154: 3961-3968.

20 Kawakami, Y, Robbins, PF, y Rosenberg, SA (1996), Keio J. Med.
45: 100-108

Köhler, G. y Milstein, C. (1975), Nature 265, 495-497

25 Kruif, J., et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:
3938-3942

Kyte, J y Doolittle, RF (1982), J. Mol. Biol. 157: 105-132

30 Lethe, B, Lucas, S, Michaux, L, De Smet, C, Godelaine, D,
Serrano, A, De Plaen, E, y Boon, T (1998), Int. J. Cancer 76:
903-908

35 Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F,

- Viel S, y Hercend T (1993), Cancer Res. 53: 3569-3573
- Marchand M, Weynants P, Rankin E et al (1995), Int. J. Cancer 63:883-885
- 5 Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., y Lotze, M.T. (1995), Nature Medicine 1, 1297-1302.
- 10 McGuinness, B.T., et al., (1996), Nature Biotechnol. 14, 1149
- Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), Curr. Opin. Immunol. 8:651-657
- 15 Murphy, G.P., Elgamal, A.A., Su, S.L., Bostwick, D.G., y Holmes, E.H. (1998), Cancer 83, 2259-2269
- Neuberger, M.S., et al., (1984), Nature 312: 604-608
- 20 Pardoll, D. M. (1998) Nature Medicine 4: 525-531
- Parker, K. C., M. A. Bednarek, y J. E. Coligan. (1994), J. Immunol. 152:163.
- 25 Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., y Kawakami, Y. (1996), J. Immunol. 157, 2539-2548.
- 30 Paterson Y, Ikonomidis G (1996), Curr. Opin. Immunol. 5: 664-9
- Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995), Immunogenetics 41:178-228
- 35 Rapellino, M, Pecchio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, y Cavallo,

261 258

- A (1995), Anticancer Res. 15: 1065-1070
- 5 Ravaoli, A., Bagli, L., Zucchini, A., y Monti, F. (1998),
Cell. Prolif. 31, 113-126
- Revillion, F, Bonnetterre, J, y Peyrat, JP (1998), Eur. J.
Cancer 34: 791-808
- Restifo NP (1996), Curr. Opin. Immunol. 5: 658-63
- 10 Riechmann, L., et al., (1988), Nature 332: 323-327
- Robbins, PF y Kawakami, Y (1996), Curr. Opin. Immunol. 8: 628-
636
- 15 Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., y
Sette, A. (1993), Cell 74, 929-937.
- Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes,
20 T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., y
Pfreundschuh, M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92,
11810-11813
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. Molecular Cloning:
25 A Laboratory Manual. ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989
- Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M,
Hofstetter A, Riethmuller G, y Segurado OG (1993), J. Immunol.
151: 4209-4220
- 30 Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kirlappos H, Mechtler K, Trska
B, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94:3262-
3267
- 35 Schweighoffer, T. (1997), Onc. Res. 3, 164-176

Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-F., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., y Chisari, F.V. (1994),
5 J. Immunol. 153, 5586-5592.

Stauss, H.J., Davies, H., Sadovnikova, E., Chain, B., Horowitz, N., y Sinclair, C. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89, 7871-7875.

10

Tepper, R.I., Pattengale, P.K., y Leder, P. (1989), Cell 57: 503-512.

15

Tighe H, Corr, M, Roman M, y Raz E (1998), Immunol. Today 19:89-97

20

Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Rensing, M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., y Offringa, R. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (26): 14660-14665

Tuting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., y Storkus, W.J., (1997), Eur. J. Immunol. 27, 2702-2707,.

25

Van den Eynde, B. y Brichard, V.G. (1995), Curr. Opin. Immunol. 7, 674-681.

Van den Eynde, BJ, y van der Bruggen, P (1997), Curr. Opin. Immunol. 9:684-693

30

van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, y T. Boon. (1991, Science 254:1643-1647

35

van der Burg, S.H., et al., (1996), J. Immunol. 156, 3308-3314

263 260

van Elsas, A., van der Minne, C.E., Borghi, M., van der Spek, C.W., Braakman, E., Osanto, S., y Schrier, P.I. (1996), CTL Recognition of an IL-2 Producing Melanoma Vaccine. En: Immunology of human melanoma. Tumor-host interaction y 5 immunotherapy, compilado por M. Maio, Amsterdam: IOS, 1996, p. 165-173

van Elsas, A., Aarnoudse, C., van der Minne, C.E., van der Spek, C.W., Brouwenstijn, N., Osanto, S., y Schrier, P.I. 10 (1997), J. Immunother. 20: 343-353.

Vaughan, T.J., et al., (1998), Nature Biotechnol. 16, 535-539

Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, y Kinzler, KW (1995), 15 Science 270: 484-487

Wang, L., et al., (1997), Mol. Immunol. 34: 609-618

Wang, RF (1997), Mol. Med. 3: 716-731
20

Wax, S.D., Rosenfield, C.L., y Taubman, M.B., (1994), J. Biol. Chem. 269, 13041-13047.

Wax, S.D., Tsao, L., Lieb, M.E., Fallon, J.T., y Taubman, M.B. 25 (1996), Lab. Invest. 74, 797-808.

Winter, G., et al., (1994), Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455

Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, 30 Rammensee, HG, Rotzschke, O, y Falk, K (1994), Int. J. Cancer 57: 413-418

Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T., y 35 Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(25):

~~26A~~

261

11671-11675.

Zitvogel, L., Mayordomo, J.I., Tjandrawan, T., DeLeo, A.B.,
Clarke, M.R., Lotze, M.T., y Storkus, W.J. (1996), J. Exp.
5 Med. 183, 87-97.

265 262

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

(1) DATOS GENERALES:

5

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: Boehringer Ingelheim International GmbH

(B) CALLE: Binger Strasse 173

(C) LOCALIDAD: Ingelheim am Rhein

10

(E) PAIS: Alemania

(F) CODIGO POSTAL: D-55216

(G) TELEFONO: ++49-6132-77-2282

(H) TELEFAX: +49-6132-77-4377

15

(ii) TITULO DEL INVENTO: Antigeno asociado con tumores

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 55

(iv) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

20

(A) SOPORTE DE DATOS: Disco blando

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25

266 263

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 2216 pares de bases
(B) TIPO: Nucleótido
(C) FORMA DE LA CADENA: cadena sencilla
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc a ARNm

10

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens
(E) TIPO DE TEJIDO: carcinoma de pulmón

15

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: 5'UTR
(B) POSICION:1..426

(ix) CARACTERISTICA:

20

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) POSICION:427..1743

(ix) CARACTERISTICA:

25

- (A) NOMBRE/CLAVE: 3'UTR
(B) POSICION:1744..2216

267 264

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

GTCACGGGAA CTGCCCTTGC TACTTGIGAC CTGCCCTTTA CTCAGCAGTT TTTGTTCTGG 60

5 GAAGCCTGG GATTCTGCTA ATACCTATCA CTGTAGGTGC TGAAGGAAA CAGATGAAGA 120

ACATGACCTC AAGGAGCTTC CTGTCAATGA GAAGACCAAG CTGACGCTG GCAAGATAT 180

TAAAGAGGAG CCGTAACTG TTCCTTGAC ATCTTATGAA TGTCAGAAA TACCTTTTGG 240

10 AGGGTTAGAA GATCAGGGGA CATGGTTGTT CACATTGCT GCCACGAAAC ACCGCCAGTC 300

TTCACCTGGG AACAGATCA CGCCTTGTA AGAGATCATC CCTAAGCAGG AGAGAAGCTA 360

15 CTAAAGGATT GTGTACTCT CCACCTTCCC TGTGCTGGT CTCCACCTGT CTCCATTCT 420

GTGACG ATG GTT CAA TGG AAG AGA CTC TGC CAG CTG CAT TAC TTG TGG 468

Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp

1 5 10

20 GCT CTG GGC TGC TAT ATG CTG CTG GCC ACT GTG GCT CTG AAA CTT TCT 516

Ala Leu Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser

15 20 25 30

25 TTC AGG TTG AAG TGT GAC TCT GAC CAC TTG GGT CTG GAG TCC AGG GAA 564

Phe Arg Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu

35 40 45

30

~~262~~

	TCT CAA AGC CAG TAC TGT AGG AAT ATC TTG TAT AAT TTC CTG AAA CTT	612
	Ser Gln Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu	
5	50 55 60	
	CCA GCA AAG AGG TCT ATC AAC TGT TCA GGG GTC ACC CGA GGG GAC CAA	660
	Pro Ala Lys Arg Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln	
	65 70 75	
10		
	GAG GCA GTG CTT CAG GCT ATT CTG AAT AAC CTG GAG GTC AAG AAG AAG	708
	Glu Ala Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys	
	80 85 90	
15	CGA GAG OCT TTC ACA GAC ACC CAC TAC CTC TCC CTC ACC AGA GAC TGT	756
	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys	
	95 100 105 110	
	GAG CAC TTC AAG GCT GAA AGG AAG TTC ATA CAG TTC CCA CTG AGC AAA	804
20	Glu His Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys	
	115 120 125	
	GAA GAG GTG GAG TTC CCT ATT GCA TAC TCT ATG GTG ATT CAT GAG AAG	852
	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys	
25	130 135 140	
	ATT GAA AAC TTT GAA AGG CTA CTG CGA GCT GTG TAT GCC CCT CAG AAC	900
	Ile Glu Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn	
	145 150 155	
30		

269 266

ATA TAC TGT GTC CAT GTG GAT GAG AAG TCC CCA GAA ACT TTC AAA GAG 948

Ile Tyr Cys Val His Val Asp Glu Lys Ser Pro Glu Thr Phe Lys Glu

160 165 170

5

GCG GTC AAA GCA ATT ATT TCT TGC TTC CCA AAT GTC TTC ATA GCC AGT 996

Ala Val Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val Phe Ile Ala Ser

175 180 185 190

10 AAG CTG GTT CGG GTG GTT TAT GCC TCC TGG TCC AGG GTG CAA GCT GAC 1044

Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val Gln Ala Asp

195 200 205

CTC AAC TGC ATG GAA GAC TTG CTC CAG AGC TCA GTG CCG TGG AAA TAC 1092

15 Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val Pro Trp Lys Tyr

210 215 220

TTC CTG AAT ACA TGT GGG ACG GAC TTT CCT ATA AAG AGC AAT GCA GAG 1140

Phe Leu Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser Asn Ala Glu

20 225 230 235

ATG GTC CAG GCT CTC AAG ATG TTG AAT GGG AGG AAT AGC ATG GAG TCA 1188

Met Val Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn Ser Met Glu Ser

240 245 250

25

GAG GTA CCT CCT AAG CAC AAA GAA ACC CGC TGG AAA TAT CAC TTT GAG 1236

Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr His Phe Glu

255 260 265 270

30

~~270~~ 267

	GTA GTG AGA GAC ACA TTA CAC CTA ACC AAC AAG AAG AAG GAT CCT CCC	1284
	Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys Asp Pro Pro	
	275 280 285	
5		
	CCT TAT AAT TTA ACT ATG TTT ACA GGG AAT GCG TAC AIT GTG GCT TCC	1332
	Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Ala Ser	
10	290 295 300	
	CGA GAT TTC GTC CAA CAT GTT TTG AAG AAC CCT AAA TCC CAA CAA CTG	1380
	Arg Asp Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser Gln Gln Leu	
	305 310 315	
15		
	ATT GAA TGG GTA AAA GAC ACT TAT AGC CCA GAT GAA CAC CTC TGG GCC	1428
	Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His Leu Trp Ala	
	320 325 330	
20	ACC CTT CAG CGT GCA CGG TGG ATG CCT GGC TCT GTT CCC AAC CAC CCC	1476
	Thr Leu Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro Asn His Pro	
	335 340 345 350	
	AAG TAC GAC ATC TCA GAC ATG ACT TCT ATT GCC AGG CTG GTC AAG TGG	1524
25	Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu Val Lys Trp	
	355 360 365	
	CAG GGT CAT GAG GGA GAC ATC GAT AAG GGT GCT CCT TAT GCT CCC TGC	1572
	Gln Gly His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr Ala Pro Cys	
30	370 375 380	

271

268

TCT GGA ATC CAC CAG CGG GCT ATC TGC GTT TAT GGG GCT GGG GAC TTG 1620
 Ser Gly Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala Gly Asp Leu
 385 390 395

5
 AAT TGG ATG CTT CAA AAC CAT CAC CTG TTG GCC AAC AAG TTT GAC CCA 1668
 Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro
 400 405 410
 AAG GTA GAT GAT AAT GCT CTT CAG TGC TTA GAA GAA TAC CTA CGT TAT 1716

10 Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr
 415 420 425 430

AAG GCC ATC TAT GGG ACT GAA CTT TGA GACACACTAT GAGAGCGTTG 1763
 Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *

15 435

CTACCTGTGG GGCAAGAGCA TGTACAAACA TGCTCAGAAC TTGCTGGGAC AGTGTGGGTG 1823

GGAGACCAGG GCTTTGCAAT TCGTGGCATC CTTTAGGATA AGAGGGCTGC TATTAGATTG 1883

20 TGGGTAAGTA GATCTTTTGC CTTCGAAATT GCTGCGTGGG TGAATGCTGC TTGTTCTCCC 1943

ACCCCTAACC CTAGTAGTTC CTCCACTAAC TTTCTCACTA AGTGAGAAATG AGAAGTCTG 2003

25 TCATAGGGAG AGTGAAGGAG GGATATGTTG TAGAGCACTT GATTTCAGTT GAATGCCCTG 2063

TGTTAGCTTT TCATTCTGT GGAGCTGCGG TTCTAATAA TTCCAGGTTT GGTAGCGTGG 2123

30

272 269

AGGAGAACTT TGATGGAAG AGAACCTTCC CTTCTGTACT GTTAACTTAA AAATAAATAG 2183

5 CTCCTGATTC AAAGTAAAA AAAAAAAAAA AAA 2216

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 439 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteina

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp Ala Leu
1 5 10 15

20 Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser Phe Arg
20 25 30

Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu Ser Gln
35 40 45

25 Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu Pro Ala
50 55 60

Lys Arg Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln Glu Ala
30 65 70 75 80

~~223~~ 270

Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu

85 90 95

Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys Glu His

5 100 105 110

Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys Glu Glu

115 120 125

10 Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys Ile Glu

130 135 140

Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr

145 150 155 160

15

Cys Val His Val Asp Glu Lys Ser Pro Glu Thr Phe Lys Glu Ala Val

165 170 175

Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val Phe Ile Ala Ser Lys Leu

20 180 185 190

Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val Gln Ala Asp Leu Asn

195 200 205

25

272 271

Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val Pro Trp Lys Tyr Phe Leu
210 215 220

Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser Asn Ala Glu Met Val
5 225 230 235 240

Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn Ser Met Glu Ser Glu Val
245 250 255

10 Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr His Phe Glu Val Val
260 265 270

Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys Asp Pro Pro Pro Tyr
275 280 285

15 Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Ala Ser Arg Asp
290 295 300

Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser Gln Gln Leu Ile Glu
20 305 310 315 320

Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His Leu Trp Ala Thr Leu
325 330 335

25 Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro Asn His Pro Lys Tyr
340 345 350

272

Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu Val Lys Trp Gln Gly

355 360 365

His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr Ala Pro Cys Ser Gly

5 370 375 380

Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala Gly Asp Leu Asn Trp

385 390 395 400

10 Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys Val

405 410 415

Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys Ala

420 425 430

15

Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *

435

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 3:

20

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2217 pares de bases

(B) TIPO: Nucleótido

(C) FORMA DE LA CADENA: cadena sencilla

25

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc a ARNm

(vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(F) TIPO DE TEJIDO: carcinoma de pulmón

(ix) CARACTERISTICA:

5 (A) NOMBRE/CLAVE: 5'UTR
(B) POSICION:1..426

(ix) CARACTERISTICA:

10 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) POSICION:427..999

(ix) CARACTERISTICA:

15 (A) NOMBRE/CLAVE: 3'UTR
1.
15

(ix) CARACTERISTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: 5'UTR
1. POSICION:1..844

20 (ix) CARACTERISTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS
1. POSICION:845..1744

(ix) CARACTERISTICA:

25 (A) NOMBRE/CLAVE: 3'UTR
1. POSICION:1745..2217

~~276~~ 273

277 274

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

	GTCACGGGAA CTGCCCTTGC TACTTGTGAC CTGCCCTTTA CTCAGCAGTT TTTGTTCTGG	60
5	GAAGCCCTGG GATTCTGCTA ATACCTATCA CTGTAGGTGC TGAAGGGAAA CAGATGAAGA	120
	ACATGACCTC AAGGAGCTTC CTGTCAATGA GAAGACCAAG CTCAGGCCTG GCAAAGATAT	180
	TAAAGAGGAG CCTGAACTG TTCCTTGGAC ATCTTATGAA TGTAGAAAA TACCTTTTGG	240
10	AGGGTTAGAA GATCAGGGGA CATGGTTGTT CACATTTGCT GCCACGGAAC ACGGCCAGTC	300
	TTCACCTGGG AACAGAATCA CGCCTTGTGA AGAGATCATC CCTAAGCAGG AGAGTAGCTA	360
15	CTAAGGATT GTGTACTCCT CCACCTTCCC TGTGCTCGGT CTCACCTGT CTCACATTCT	420
	GTGACG ATG GTT CAA TGG AAG AGA CTC TGC CAG CTG CAT TAC TTG TGG	468
	Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp	
	1 5 10	
20	GCT CTG GGC TGC TAT ATG CTG CTG GCC ACT GTG GCT CTG AAA CTT TCT	516
	Ala Leu Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser	
	15 20 25 30	
25	TTC AGG TTG AAG TGT GAC TCT GAC CAC TTG GGT CTG GAG TCC AGG GAA	564
	Phe Arg Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu	
	35 40 45	
30		

278 275

	TCT CAA AGC CAG TAC TGT AGG AAT ATC TTG TAT AAT TTC CTG AAA CTT	612
	Ser Gln Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu	
	50 55 60	
5		
	CCA GCA AAG TGG TCT ATC AAC TGT TCA GGG GTC ACC CGA GGG GAC CAA	660
	Pro Ala Lys Trp Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln	
	65 70 75	
10	GAG GCA GTG CTT CAG GCT ATT CTG AAT AAC CTG GAG GTC AAG AAG AAG	708
	Glu Ala Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys	
	80 85 90	
	CGA GAG CCT TTC ACA GAC ACC CAC TAC CTC TCC CTC ACC AGA GAC TGT	756
15	Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys	
	95 100 105 110	
	GAG CAC TTC AAG GCT GAA AGG AAG TTC ATA CAG TTC CCA CTG AGC AAA	804
	Glu His Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys	
20	115 120 125	
	GAA GAG GTG GAG TTC CCT ATT GCA TAC TCT ATG GTG AIT CAT GAG AAG	852
	Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys	
	130 135 140	
25		
	ATT GAA AAC TTT GAA AGG CTA CTG CGA GCT GTG TAT GCC CCT CAG AAC	900
	Ile Glu Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn	
	145 150 155	
30		

229 276

	ATA TAC TGT GTC CAT GTG GAT GAA GAA GTC CCC AGA AAC TTT CAA AGA	948
	Ile Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe Gln Arg	
	160 165 170	
5	GGC GGT CAA AGC AAT TAT TTC TTG CTT CCC AAA TGT CTT CAT AGC CAG	996
	Gly Gly Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln	
	175 180 185 190	
	TAA GCTGGTTCGG GTGGTTTATG CCTCCTGGTC CAGGGTGCAA GCTGACCTCA	1049
10	*	
	ACTGCATGGA AGACTTGCTC CAGAGCTCAG TGCCGTGGAA ATACTTCCTG AATACATGTG	1109
	GGACGGACTT TCCTATAAAG AGCAATGCAG AGATGGTCCA GGCTCTCAAG ATGTTGAATG	1169
15	GGAGGAATAG CATGGAGTCA GAGGTACCTC CTAAGCACAA AGAAACCGC TGGAAATATC	1229
	ACTTTGAGGT AGTGAGAGAC ACATTACACC TAACCAACAA GAAGTAGGAT CTTCCCCCTT	1289
20	ATAATTAAAC TATGTTTACA GGGATGCGT ACATTGTGGC TTCCCGAGAT TTGTTCCAAC	1349
	ATGTTTTGAA GAACCTAAA TCCCAACAAC TGATTGAATG GGTAAAAGAC ACTTATAGCC	1409
	CAGATGAACA CCTCTGGGCC ACCCTTCAGC GTGCACGGTG GATGCCTGGC TCTGTTCCCA	1469
25	ACCACCCCAA GTACGACATC TCAGACATGA CTTCTATTGC CAGGCTGGTC AAGTGGCAGG	1529
	GTCATGAGGG AGACATGGAT AAGGGTGCTC CTTATGCTCC CTGCTCTGGA ATCCACCAGC	1589
30	GGGCTATCTG CGTTTATGGG GCTGGGACT TGAATTGGAT GCTTCAAAAC CATCACCTGT	1649

280 277

	TGGCCAACAA GTTTGACCCA AAGGTAGATG ATAATGCTCT TCAGTGCTTA GAAGAATACC	1709
	TACGTTATAA GGCCATCTAT GGGACTGAAC TTTGAGACAC ACTATGAGAG CGTTGCTACC	1769
5	TGTGGGGCAA GAGCATGTAC AAACATGCTC AGAACTTGCT GGGACAGTG GGGTGGGAGA	1829
	CCAGGGCTTT GCAATTCGTG GCATCCTTTA GGATAAGAGG GCTGCTATTA GATTGTGGGT	1889
10	AAGTAGATCT TTTGCCTTGC AAATTGCTGC CTGGGTGAAT GCTGCTTGTT CTCTACCCC	1949
	TAACCTAGT AGTTCCTCCA CTAACCTTCT CACTAAGTGA GAATGAGAAC TGCTGTGATA	2009
	GGGAGAGTGA AGGAGGGATA TGTGGTAGAG CACTTGATTT CAGTTGAATG CCGCTGGTA	2069
15	GCPTTCCAT TCTGTGGAGC TGCCGTTCCT AAATAATCCA GGTGTGGTAG CGTGGAGGAG	2129
	AACTTTGATG GAAAGAGAAC CTTCCCTTCT GTACTGTAA CTTAAAAATA AATAGCTCCT	2189
20	GATTCAAAGT AAAAAAAAAA AAAAAAA	2217

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25
- (A) LONGITUD: 191 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteina

281 278

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

Met Val Gln Trp Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu Trp Ala Leu
1 5 10 15
5
Gly Cys Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu Ser Phe Arg
20 25 30
Leu Lys Cys Asp Ser Asp His Leu Gly Leu Glu Ser Arg Glu Ser Gln
10 35 40 45
Ser Gln Tyr Cys Arg Asn Ile Leu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu Pro Ala
50 55 60
15 Lys Trp Ser Ile Asn Cys Ser Gly Val Thr Arg Gly Asp Gln Glu Ala
65 70 75 80
Val Leu Gln Ala Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu
85 90 95
20 Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys Glu His
100 105 110
Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys Glu Glu
25 115 120 125
Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr Ser Met Val Ile His Glu Lys Ile Glu
130 135 140

282 279

Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr
145 150 155 160

Cys Val His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe Gln Arg Gly Gly
5 165 170 175

Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln *
180 185 190

10 (2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2217 pares de bases

(B) TIPO: Nucleótido

15 (C) FORMA DE LA CADENA: cadena sencilla

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc a ARNm

20 (vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(F) TIPO DE TEJIDO: carcinoma de pulmón

(ix) CARACTERISTICA:

25 (A) NOMBRE/CLAVE: 5'UTR

(B) POSICION:1..844

(ix) CARACTERISTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

280 283

(B) POSICION:845..1744

(1X) CARACTERISTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: 3'UTR

(B) POSICION:1745..2217

5

(X1) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

60	GRACGGGA CCGCCCTTC TACTGTGAC CCGCCCTTA CCGACGATT TTGTCTTCG
120	GAACCCCTCG GATCTGCTA ATACCTTACA CTGTGCTTC TAAAGGAA CAGTAAAGA
180	ACATGACCTC AACGACCTTC CTGTCAATGA GAAGCCAG CTGACCCCTG GCAAGATAT
240	TAAAGAGG CCGAATCTG TTCCTTGAC ACTTATAGA TGTAAAAA TACCTTTTCG
300	AGGTTAAGA GATCAGGGA CATGTTGTT CACTTTCT GCGACGAGAC ACCGCCAGTC
360	TTCACTTCG AACAGATCA CCGCTTGA AAGATCAT CCAAGCAGG AAGAACTTA
420	CMAAGGAT GTGTACTCT CCACTTCC TGTGCTGGT CTGACCTGT CCGCAATCT
480	GTAGGATCG TTCAATGGA GACTCTCC CAGCTGCATT ACTGTGGCG TGTGGCTTC
540	TATATCTTC TCGCCACTGT GCGTGTGA CCTTCTTCA GGTGGAATG TCACTCTGAC
600	CACCTGGGTC TGAGTCCAG GAATCTCA ACCGACTACT GTAGGATAT CTGTATATAT
660	TTCCGAAAC TTCCAGCAA GTGCTTATC AACTGTGAC GGTTCACCCG AGGGGACCA

284 281

	GAGGCAGTGC TTCAGGCTAT TCTGAATAAC CTGGAGGTCA AGAAGAAGCG AGAGCCTTTC	720
	ACAGACACCC ACTACCTCTC CCTCACCAGA GACTGTGAGC ACTTCAAGGC TGAAGGAAG	780
5	TTCATACAGT TCCCACTGAG CAAAGAAGAG GTGGAGTTC CTATTGCATA CTCTATGGTG	840
	ATTG ATG AGA AGA TTG AAA ACT TTG AAA GGC TAC TGC GAG CTG TGT ATG	889
	Met Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu Cys Met	
10	1 5 10 15	
	CCC CTC AGA ACA TAT ACT GTG TCC ATG TGG ATG AAG AAG TCC CCA GAA	937
	Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met Trp Met Lys Lys Ser Pro Glu	
	20 25 30	
15	ACT TTC AAA GAG GCG GTC AAA GCA ATT ATT TCT TGC TTC CCA AAT GTC	985
	Thr Phe Lys Glu Ala Val Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val	
	35 40 45	
20	TTC ATA GCC AGT AAG CTG GTT CGG GTG GTT TAT GCC TCC TGG TCC AGG	1033
	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg	
	50 55 60	
	GTG CAA GCT GAC CTC AAC TGC ATG GAA GAC TTG CTC CAG AGC TCA GTG	1081
25	Val Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	
	65 70 75	
	COG TGG AAA TAC TTC CTG AAT ACA TGT GGG ACG GAC TTT OCT ATA AAG	1129
	Pro Trp Lys Tyr Phe Leu Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys	
30	80 85 90 95	

285 282

	AGC AAT GCA GAG ATG GTC CAG GCT CTC AAG ATG TTG AAT GGG AGG AAT	1177
	Ser Asn Ala Glu Met Val Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn	
	100 105 110	
5		
10	AGC ATG GAG TCA GAG GTA CCT CCT AAG CAC AAA GAA ACC CGC TGG AAA	1225
	Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys	
	115 120 125	
	TAT CAC TTT GAG GTA GTG AGA GAC ACA TTA CAC CTA ACC AAC AAG AAG	1273
15	Tyr His Phe Glu Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys	
	130 135 140	
	AAG GAT CCT CCC CCT TAT AAT TTA ACT ATG TTT ACA GGG AAT GCG TAC	1321
	Lys Asp Pro Pro Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr	
20	145 150 155	
	ATT GTG GCT TCC CGA GAT TTC GTC CAA CAT GTT TTG AAG AAC CCT AAA	1369
	Ile Val Ala Ser Arg Asp Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys	
	160 165 170 175	
25		
	TCC CAA CAA CTG ATT GAA TGG GTA AAA GAC ACT TAT AGC CCA GAT GAA	1417
	Ser Gln Gln Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu	
	180 185 190	
30		
	CAC CTC TGG GCC ACC CTT CAG CGT GCA CGG TGG ATG CCT GGC TCT GTT	1465

286 283

His Leu Trp Ala Thr Leu Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val

195 200 205

CCC AAC CAC CCC AAG TAC GAC ATC TCA GAC ATG ACT TCT ATT GCC AGG 1513

5 Pro Asn His Pro Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg

210 215 220

10 CTG GTC AAG TGG CAG GGT CAT GAG GGA GAC ATC GAT AAG GGT GCT CCT 1561

Leu Val Lys Trp Gln Gly His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro

225 230 235

TAT GCT CCC TGC TCT GGA ATC CAC CAG CGG GCT ATC TGC GTT TAT GGG 1609

15 Tyr Ala Pro Cys Ser Gly Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly

240 245 250 255

GCT GGG GAC TTG AAT TGG ATG CTT CAA AAC CAT CAC CTG TTG GCC AAC 1657

Ala Gly Asp Leu Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn

20 260 265 270

AAG TTT GAC CCA AAG GTA GAT GAT AAT GCT CTT CAG TGC TTA GAA GAA 1705

Lys Phe Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu

275 280 285

25

TAC CTA CGT TAT AAG GCC ATC TAT GGG ACT GAA CTT TGA GACACACTAT 1754

Tyr Leu Arg Tyr Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *

290 295 300

30 GAGAGCGTTG CTACCTGTGG GGCAAGAGCA TGTACAAACA TGCTCAGAAC TTGCTGGGAC 1814

282 284

AGTGTGGGTG GGAGACCAGG GCTTTGCAAT TCGTGGCATC CTTTAGGATA AGAGGGCTGC 1874

TATTAGATTG TGGGTAAGTA GATCTTTTGC CTTGCAAATT GCTGCCTGGG TGAATGCTGC 1934

5 TTGTTCTCTC ACCCCTAACC CTAGTAGTTC CTCCTACTAC TTTCTACTA AGTGAGAATG 1994

AGAACTGCTG TGATAGGGAG AGTGAAGGAG GGATATGTGG TAGAGCACTT GATTTCAGTT 2054

10 CAATGCCTGC TGGTAGCTTT TCCATTCTGT GGAGCTGCCG TTCTTAATAA TTCCAGGTTT 2114

GGTAGCGTGG AGGAGAACTT TGATGGAAAG AGAACCTTCC CTTCTGTACT GTTAACTTAA 2174

AAATAAATAG CTCCTGATTC AAAGTAAAAA AAAAAAAAAA AAA 2217

15

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 300 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteina

25

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

Met Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro

1 5 10 15

30

~~288~~ 285

Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met Trp Met Lys Lys Ser Pro Glu Thr

20 25 30

Phe Lys Glu Ala Val Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val Phe

5 35 40 45

10 Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val

50 55 60

Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val Pro

65 70 75 80

15

Trp Lys Tyr Phe Leu Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser

85 90 95

Asn Ala Glu Met Val Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn Ser

20 100 105 110

Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr

115 120 125

25 His Phe Glu Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys

130 135 140

Asp Pro Pro Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile

145 150 155 160

30

~~289~~ 286

Val Ala Ser Arg Asp Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser

165

170

175

Gln Gln Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His

5

180

185

190

Leu Trp Ala Thr Leu Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro

195

200

205

10 Asn His Pro Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu

210

215

220

Val Lys Trp Gln Gly His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr

225

230

235

240

15

Ala Pro Cys Ser Gly Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala

245

250

255

Gly Asp Leu Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys

20

260

265

270

Phe Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr

275

280

285

25 Leu Arg Tyr Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *

290

295

300

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 7:

30

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

(A) LONGITUD: 25 pb

290 287

(B) TIPO: ácido nucleico
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

5

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

TCAATGAGAA GACCAAGCTG ACGCC

23

10

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pb
(B) TIPO: ácido nucleico
(D) TOPOLOGIA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

20

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

GGGAGACAGG TGGAGACCGA GC

23

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 9:

25

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

(A) LONGITUD: 26 pb
(B) TIPO: ácido nucleico
(D) TOPOLOGIA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

35

TCACGGGAAC TGCCCTTGCT ACTTGT

23

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 10:

40

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

291 288

- (A) LONGITUD: 27 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

10 GCTCCTTGAG GTCATGTTCT TCATCTG 27

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- 15 (A) LONGITUD: 21 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

20

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

GGAGACCGAG CACAGGGAAG G 21

25

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- 30 (A) LONGITUD: 21 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

35 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

CCTTCCCTGT GTCGGTCTC C 21

40

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 13:

~~292~~ 289

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- (A) LONGITUD: 20 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

10 TCGAGTCGAC TATATGTACC

20

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 14:

15

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- (A) LONGITUD: 22 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

AAGGTGAAGG TCGGAGTCAA CG

22

25

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

30

- (A) LONGITUD: 24 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

35

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

GGCAGAGATG ATGACCCTTT TGGC

24

40

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 16:

293

290

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- (A) LONGITUD: 27 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

10 GACCAGGAGG CATAAACCAC CCGAACC

27

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 17:

15

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- (A) LONGITUD: 28 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

25 TTCCATCAAA GTTCTCCTCC ACGCTACC

28

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

30

- (A) LONGITUD: 28 pb
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

35

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

CATCCAATTC AAGTCCCCAG CCCCATAA

28

40

~~291~~ 291

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- 5 (A) LONGITUD: 43 pb
(B) TIPO: ácido nucleico
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

10 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

TGTAGCGTGA AGACGACAGA AAGGGCGTGG TACCGAGCTC GAG

43

15 (2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- 20 (A) LONGITUD: 22 pb
(B) TIPO: ácido nucleico
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

25

AGGGCGTG GT ACCGAGCTCG AG

22

30 (2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA::

- 35 (A) LONGITUD: 11 pb
(B) TIPO: ácido nucleico
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Desoxirribonucleótido sintético

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

40

GGCTCGAGCT C

11

~~295~~

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

5

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

10 Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu
1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 23:

15

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

25 Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met
1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

296 293

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

5

Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys

1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 25:

10

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe

1 5 9

20

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

25

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

30

Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr

1 5 9

292 294

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 27:

5 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

10 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu
1 5 9

15

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

20 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

25 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

Pro Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Phe
1 5 9

30 (2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 29:

~~298~~ 295

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr

1 5 9

10

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

20

Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala

1 5 9

25 (2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

30 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

299

296

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val

1 5 9

5

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

15

Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu

1 5 9

20

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

25

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

30

Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys

1 5 9

300 297

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

10

Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys

1 5 9

15 (2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
20 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys

25 1 5 10

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 36:

30 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos

30+ 298

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

5

Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr

1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 37:

10

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 37:

Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu

1 5 9

20

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 38:

30

Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys

1 5 9

299

302

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

10 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 39:

Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu
1 5 9

15

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 40:

25 Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr
1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 41:

30

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

303

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

5 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 41:

Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys
1 5 9

10

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

15 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 42:

20 Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr
1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 43:

25

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 43:

301

Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr Cys Val
1 5 9

5

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 44:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 44:

15 Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val
1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 45:

20

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 45:

His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn
1 5 9

30

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 46:

~~305~~ 302

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

5 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 46:

Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe
10 1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 47:

15 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

20 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 47:

Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr
1 5 9

25

~~306~~

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 48:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 48:

10

Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys

1 5 9

15 (2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 49:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20 (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 49:

Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln

25 1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 50:

30 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

~~302~~ 304

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 50:

5 Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr
1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 51:

10 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 51:

Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu
1 5 9

20

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 52:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

25 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 52:

30 Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg
1 5 9

~~308~~ 305

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 53:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 53:

10 Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr
1 5 9

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 54:

15 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

20 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 54:

Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val
1 5 9

25

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 55:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

30 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

~~309~~

306

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 55:

Pro	Leu	Arg	Thr	Tyr	Thr	Val	Ser	Met
1					5			9

REIVINDICACIONES

1.- Antígeno asociado a tumores con la denominación de
5 B99, seleccionado entre el grupo de polipéptidos que
presentan la secuencia de aminoácidos que se indica en SEQ
ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6.

2.- Fragmento de proteína o péptido inmunógeno,
caracterizado porque se deriva de un antígeno asociado con
10 tumores, definido en la reivindicación 1.

3.- (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación
1 ó 2, que provoca una respuesta inmunitaria humoral.

4.- (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación
1 ó 2, cuyo o cuyos producto(s) de degradación es (son)
15 presentados por moléculas del MHC y provocan una respuesta
inmunitaria celular.

5.- Péptido inmunógeno según la reivindicación 4,
seleccionado entre el grupo de péptidos según SEQ ID NO:22
hasta 55.

20 6.- (Poli)péptido inmunógeno según una de las reivin-
dicaciones 1 a 5 para la inmunoterapia de enfermedades de
cáncer *in vivo* o *ex vivo*, induciendo el (poli)péptido una
respuesta inmunitaria contra células de tumores del pacien-
te, que expresan B99.

25 7.- Composición farmacéutica para la administración
por vía parenteral, tópica, oral o local, caracterizada
porque como componente activo contiene uno o varios (po-
li)péptidos inmunógenos según una de las reivindicaciones 1
a 5.

30 8.- Composición farmacéutica según la reivindicación
7, caracterizada porque contiene diferentes péptidos
inmunógenos derivados de B99.

9.- Composición farmacéutica según la reivindicación
8, caracterizada porque contiene uno o varios péptidos
35 derivados de B99 en mezcla con péptidos derivados de otros
antígenos asociados con tumores.

10.- Composición farmacéutica según la reivindicación

8 ó 9, caracterizada porque los péptidos se fijan a por lo menos dos diferentes tipos de HLA.

11.- Molécula de ADN aislada, que codifica una proteína con las propiedades inmunógenas de un antígeno asociado con tumores, definido en la reivindicación 1, o fragmentos de éste.

12.- Molécula de ADN según la reivindicación 12, que codifica un polipéptido inmunógeno con la denominación de B99 que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:2, 4 ó 6 o fragmentos de proteínas o péptidos derivados de éste.

13.- Molécula de ADN según la reivindicación 12, caracterizada porque es un polinucleótido con la secuencia representada en SEQ ID NO:1, 3 ó 5 o se hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido de la secuencia representada en SEQ ID NO:1, 3 ó 5.

14.- Molécula de ADN recombinante, que contiene una molécula de ADN según una de las reivindicaciones 11 a 13.

15.- Molécula de ADN según una de las reivindicaciones 11 a 14, para la inmunoterapia de enfermedades de cáncer, induciendo el (poli)péptido de B99 expresado por la molécula de ADN una respuesta inmunitaria contra células de tumores del paciente, que expresan el B99.

16.- Composición farmacéutica, que contiene como constituyente activo una o varias de las moléculas de ADN definidas en una de las reivindicaciones 11 a 15.

17.- Utilización de células que expresan el antígeno asociado con tumores definido en la reivindicación 1, para la preparación de una vacuna contra el cáncer.

18.- Anticuerpo contra un (poli)péptido definido en una de las reivindicaciones 1 a 5.

19.- Anticuerpo según la reivindicación 18, caracterizado porque es monoclonal.

20.- Anticuerpo según la reivindicación 18 ó 19 para la terapia y el diagnóstico de enfermedades de cáncer que están asociadas con la expresión de B99.

13/2

RESUMEN

Antígeno asociado con tumores, péptidos inmunógenos
5 derivados de éste y moléculas de ADN que lo codifican así
como su utilización en la inmunoterapia de enfermedades de
cáncer.

Tumor



mama AC
Pulmón AC
Pulmón SCC
RCC
Colon AC
A549
Testigo +
Testigo -

Normal



Colon
Corazón
Hígado
Pulmón
Bazo
Riñón
Testículos
A549
Testigo +

Fig. 1

Handwritten signature or initials.



Páncreas normal

Páncreas normal

Páncreas normal

Tumor de páncreas

Tumor de páncreas

Tumor de páncreas

A549

Testigo -

Marcador

Colon AC

Colon AC

Colon AC

Colon AC

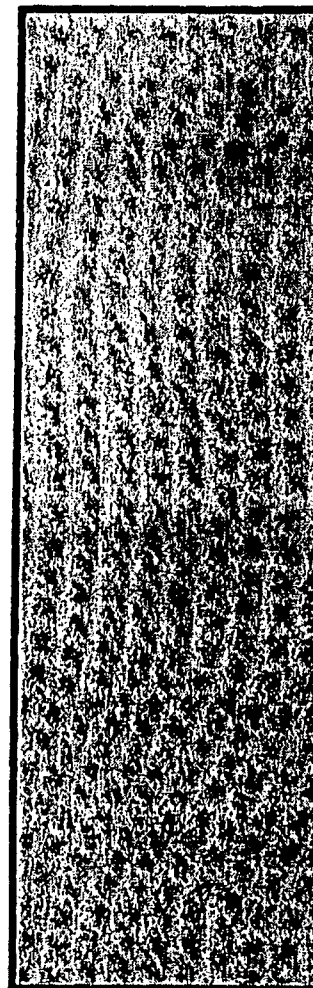
Colon normal

Colon normal

Colon normal

Fig. 2

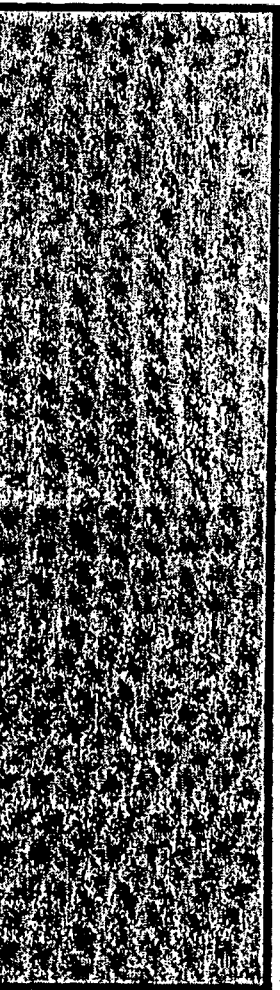
317



+4.4

-2.4

-1.35



PBL

Colon

Intestino delgado

Ovario

Testículos

Próstata

Timo

Bazo

Páncreas

Riñón

Músculo

Hígado

Pulmón

Placenta

Cerebro

Corazón

Fig. 3

2/5

7.5

kb