

318 315

CAVELIER
ABOGADOS

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

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

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria
E. S. D.



00 30397

Radicacion : 00030397 00000003 Folios: 91
Fecha (AMD): 2000-12-12 17:19:50
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Referencia : Expediente No. 00.030.397

Solicitante : BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

Asunto : Solicitud de patente para: "ANTIGENO ASOCIADO
CON TUMORES"

Fecha de la solicitud : 27 de abril de 2000

TRAMITE:02 - EVENTO:01 - ACTUACION:444

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al auto número 1253, notificado por estado del 14 de septiembre de 2000.

Para atender a la providencia anterior solicité un plazo por medio de mi memorial número 00030397 00000002 radicado el 26 de octubre de 2000.

2. Mediante el auto número 1253 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1. En la descripción. Presento junto con este memorial una nueva descripción, en la cual el solicitante ha decidido eliminar la figura 3, referida en la página 33. En consecuencia, las figuras han sido renumeradas. Al comentario del señor Examinador donde indica que en la página 10 no hay coincidencia de la secuencia B99-3 con la secuencia B99-1, el solicitante aclara que la secuencia B99-3 desde la posición 28 a la posición 299 es idéntica con la secuencia B99-1 desde la posición 167 a la posición 438. En consecuencia se presenta dicha página 10 corregida.

2.2. En las reivindicaciones. Presento con este escrito un nuevo pliego reivindicatorio en el cual se dividió la reivindicación 14.

Con respecto a la reivindicación 2, el solicitante desea aclarar que la característica de los fragmentos en la reivindicación 2, es que dichos fragmentos tienen que ser inmunogénicos. En la descripción se describe ampliamente cómo seleccionar los fragmentos que cumplen los requerimientos para ser inmunogénicos. Es casi imposible definir en detalle las pruebas por medio de las cuales se seleccionan los fragmentos dentro de dicha reivindicación. Por lo tanto el solicitante considera que dichos fragmentos están definidos per se.

En las reivindicaciones 19 y 20, el solicitante no desea reivindicar un anticuerpo específico, caracterizado por su secuencia o por un depósito. Dichas reivindicaciones se encuentran dirigidas a una clase genérica de anticuerpos que se unen a las proteínas novedosas (antígenos) de la invención, por lo que se puede considerar que dichos anticuerpos están definidos por la especificidad de los mismos.

Le solicito se sirva aceptar este nuevo capítulo reivindicatorio en sustitución del presentado originalmente.

Finalmente, solicito a Usted, muy comedidamente, que si el examinador encuentra alguna discrepancia con respecto a alguna de las anteriores explicaciones, éstas sean informadas junto con el examen de fondo y no constituyan impedimento substancial para el buen desarrollo de esta solicitud de patente.

2.3. Dibujos. Presento junto con este escrito los dibujos de las figuras 1 a 4 que se mencionan en la descripción.

2.4. Copia Certificada. Me permito informarle que la 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 sus reivindicaciones y carátula, en la cual se

320

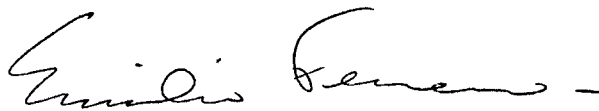
317

basa la reivindicación de la prioridad fue presentada junto con mi memorial 00030397 00000001 del día 24 de julio de 2000.

2.5. Recibos. Presento junto este escrito, el recibo de pago por valor de \$68.000.00 por concepto de modificaciones en solicitud pendiente.

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá, 12 Dic. 2000
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

Antígeno asociado con tumores

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

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; 5 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 10 *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 15 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 20 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 25 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, 30 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 35 por los CTLs (Boon y colaboradores, 1994; van den Eynde y van der Bruggen, 1997).

Las células T reconocen a antígenos como fragmentos

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

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

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

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

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
5 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 B99-3 (SEQ ID NO:6) desde la posición 28 a la posición
10 posición 167 a la posición 438.

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
15 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
20 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.

25 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
30 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
35 y finalmente una reactividad aumentada frente a tumores. Las modificaciones en la región de los epítipos para B99 pueden ser llevadas a cabo en la proteína total de B99 (ésta es

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).

Es conocido que los antígenos asociados con tumores pueden presentar mutaciones específicas para tumores, que contribuyen a una diferenciación inmunológica entre un tumor y un tejido normal (Mandrizzato y colaboradores, 1997; Hogan y colaboradores, 1998; Gaudi y colaboradores, 1999; Wölfel y colaboradores, 1995). Con el fin de comprobar la presencia de mutaciones de B99 específicas para tumores, convenientemente con ayuda de sondas procedentes de sondas del ADNc aislado conforme al invento, se clona el ADNc de B99 procedente de uno o varios tumores diferentes, y las secuencias obtenidas se comparan con el ADNc de B99 de un tejido normal. Es de esperar que los péptidos de B99 de un tumor procedentes de un segmento de secuencia mutado con respecto al de B99 de un tejido normal, presenten una inmunogenicidad aumentada en comparación con los péptidos de B99 de tejido normal procedentes del correspondiente segmento. El presente invento concierne por consiguiente en otro aspecto a péptidos de B99, que se derivan de regiones de un B99 expresado en tumor, que presentan mutaciones específicas para tumores.

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 5 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 10 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 15 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 20 moléculas del MHC y producen una respuesta inmunitaria 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.

25 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 referente 30 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 35 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 determinadas 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 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 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 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 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 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 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 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 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.

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, preferi-
5 blemente 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
10 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
15 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
20 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
25 y colaboradores, 1996; en este contexto se propone la 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
30 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
35 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 pueden utilizar métodos habituales, p.ej. usando un sintetizador automático de péptidos adquirible en el comercio.

5 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" o "péptidos retro-inversos". Para el ensayo de estas moléculas en lo referente a la utilizabilidad terapéutica en
10 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 presente invento y los fragmentos de proteínas, péptidos o
15 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
20 utilizados para la terapia de tumores positivos para B99, especialmente en los casos de carcinomas de células renales, pulmón, colon, páncreas, mama y estómago.

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

25 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)
30 ser suficiente para conseguir una respuesta eficaz de CTL al tumor que es portador de los antígenos.

El invento concierne por consiguiente en otro aspecto adicional a una composición farmacéutica para la administración por vía parenteral, tópica, oral o local. Preferible-
35 mente, 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 farmacéuti-
camente aceptable, preferiblemente acuoso. La composición
puede contener además de ello sustancias coadyuvantes
usuales, tales como tampones, etc. Los TAAs/ péptidos se
5 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, polycatio-
nes, tales como poliarginina o polilisina. Los péptidos se
10 pueden fijar también a componentes, que ayuden a la induc-
ción 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 estimulad-
oras de la inmunidad, p.ej. citoquinas (IL-2, IFN- γ). Métodos
y formulaciones, que se adecuan para la preparación y
15 administración de la composición farmacéutica conforme al
invento, se describen en los documentos WO 95/04542 y WO
97/30721, a cuya divulgación se hace referencia por la
presente.

Los B99 (fragmentos) o péptidos de B99 se pueden
20 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 conjunta-
mente con APCs y péptidos de B99 o la proteína de B99. Luego
se deja que los CTLs activados se expandan, después de lo
25 cual son administrados de nuevo al paciente. Alternativamen-
te, 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,
30 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 equiva-
35 lentes a péptidos de B99. En una forma adicional de realiza-
ción se combinan péptidos de B99 con péptidos que se derivan
de otros TAAs. La elección de péptidos para tales combina-

- ciones se efectúa en atención a la clasificación de diferentes tipos de MHC, para cubrir una población lo más amplia que sea posible de pacientes y/o se adapta a un espectro de indicaciones lo más amplio que sea posible, combinando
- 5 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 contiene una vacuna aplicable químicamente de 1 a 15, preferiblemente de 3 a 10 diferentes péptidos.
- 10 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 paciente a la respuesta inmunitaria humoral o celular provocada por el péptido inmunógeno. Con ello existe la
- 15 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 el aumento de células T precursoras en los PBLs, que presentan una reactividad contra el epítipo definido para
- 20 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 caracterizar la evolución de la enfermedad de un tumor positivo para B99 (p.ej. mediante análisis inmuno-histoquí-
- 25 micos 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 c-erbB-2 como marcador relevante en
- 30 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
- 35 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.

Por "condiciones rigurosas" se entiende p.ej.: incubar durante una noche a 65°C-68°C con 6xSSC (1xSSC = NaCl 150 mM, citrato de tri-sodio 15 mM), 5x solución de Denhardt, SDS (dodecil-sulfato de sodio) al 0,2%, ADN de espermatozoos de salmón 50 µg/ml, a continuación de ello lavar dos veces durante 30 min con 2xSSC, SDS al 0,1% a 65°C, una vez durante 30 min con 0,2xSSC, SDS al 0,1% a 65°C y eventualmente enjuagado final con 0,1xSSC, SDS al 0,1% a 65°C, o condiciones equivalentes.

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 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 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.

5 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 immuno-
10 terapia 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 intramus-
15 cular 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,
20 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
25 conjuntamente diferentes sustancias coadyuvantes que refuerzan 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.

30 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 vacuna celular contra el cáncer.

El presente invento concierne por consiguiente en otro
35 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 correspondientemen-

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 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 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 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 (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 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.

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-

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 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 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 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, mama y estómago.

Por causa de la expresión preferida de B99 en células de tumores se puede suponer que esta proteína tiene una función importante para el tumor, p.ej. para su génesis, infiltración y crecimiento. El B99 (ADN) se puede utilizar por lo tanto en análisis de escrutinio, a fin de identificar sustancias que modulen, especialmente inhiban, la actividad de esta proteína. En una forma de realización, uno de tales análisis puede consistir en incorporar la proteína de B99, o un fragmento activo de ella, en células, que reaccionan con proliferación a la actividad de B99, o llevar a expresión en la célula el correspondiente ADN de B99, y determinar la proliferación de las células en presencia y en ausencia de una sustancia de ensayo. Las sustancias con un efecto inhibitor de la proliferación se pueden utilizar para el tratamiento de tumores con fuerte expresión de B99, especialmente en el caso de los carcinomas de células

~~346~~ 343

renales, pulmón, colon y mama así como en el caso del linfoma de Hodgkin.

Recopilación de las Figuras:

- 5 Figura 1: Análisis por RT-PCR de conjuntos de ADNc de diferentes tejidos de tumores y normales humanos mediante cebadores específicos para B99
- Figura 2: Análisis por RT-PCR de ADNc's individuales de diferentes tejidos de tumores y normales humanos mediante cebadores específicos para B99
- 10 Figura 3: Análisis inmuno-histoquímicos de cuatro casos diferentes de adenocarcinomas con suero de B99.
- Figura 4: Estabilización del MHC en células de T2 mediante diferentes concentraciones de péptidos de B99.

Ejemplo 1

- 20 RDA (análisis diferencial representativo) de la línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón (A549) y de 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 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 4 ml de una solución de tripsina (datos por cada litro: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,13 g de Na₂HPO₄ anhidro, 0,2 g de KH₂PO₄, 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 capacidad, se mezclaron con 8 ml de PBS, se centrifugaron a

347
344

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, MgCl₂ 1,5 mM, NP40 al 0,5%), se agitó enérgicamente 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 al 20% de SDS se extrajo dos veces con el volumen doble de una mezcla de CHCl₃ y fenol (1:1 v/v) y una vez con el volumen simple de CHCl₃. 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 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 representativo (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 correspondientemente al protocolo del fabricante mediando 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:

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 nuevas hacen posible mediante la presencia de tres nuevos

348 345

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
5 fragmentos de ADNc. El diseño de una secuencia de cebador y adaptador con varios sitios de corte con enzimas de restricción 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
10 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
15 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
20 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
25 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-
30 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
35 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 .

5 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.

10 **Ejemplo 2**

Secuenciación y anotación de ADN candidatos a TAA

El ADN de plásmido aislado de todos los 712 clones (véase el Ejemplo 1) fue secuenciado de acuerdo con el método de Sanger en un aparato ABI-Prism. Las secuencias
15 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
20 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
25 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
30 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 inmunita-
35 riamente 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 (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).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 20 µl 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%), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM (Promega), polimerasa de ADN-Taq 0,025 U/ml (Promega), en cada caso 5 pM de 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 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 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 candidatos.

Ejemplo 3

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

Para el análisis por RT-PCR se utilizaron conjuntos de
5 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
mediante AMV-RT (Promega) correspondiendo a las recomenda-
10 ciones 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

352
349

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 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.

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
		Intestino delgado	1/1
15		Ovario	0/1
		Testículos	0/4
		Próstata	0/1
		Timo	0/1
		Bazo	0/4
20		Músculo	0/1
		Cerebro	0/1
		Corazón	0/4

25 Para el análisis pr 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). En tales casos se manifestó solamente en
el colon y de modo claramente más

35A 351

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.

15 **Ejemplo 5: Detección de la expresión de proteínas de B99 en tumores humanos**

 Para la detección de la expresión de proteínas de B99 se generaron anticuerpos específicos para B99 en conejos. Para la inmunización se utilizó la proteína de fusión bacteriana pGEX-ORF2-1/1 (posiciones 1.278 hasta 1.740 en
20 SEQ ID NO:1), el suero obtenido se purificó por afinidad mediante el péptido B99-KML (SEQ ID NO:61). Para la comprobación de la reactividad específica del suero el cuadro de lectura total de B99 se expresó transitoriamente como proteína de fusión con GFP en células de COS y las células
25 transfectadas se ensayaron en la transferencia Western con el suero B99-NKF. En tal caso se puso de manifiesto que el suero reacciona claramente con la proteína de fusión de B99 expresada. En la sucesión ulterior se analizaron por vía inmuno-histoquímica 56 muestras de diferentes tipos de
30 tumores con el suero B99-NKF en cuanto a expresión de B99 (Tabla 2). En tal caso, en 53 casos se manifestó una expresión de B99 en las células de tumores. Ejemplos de ello pueden verse en la Figura 3, que muestra los análisis inmuno-histoquímicos de cuatro diferentes casos de adenocar-
35 cinomas (a: colon; b: mama; c: páncreas; d: estómago). En todos los casos puede observarse una clara coloración de las células de tumores, mientras que los tejidos conjuntivos y

los vasos no muestran ninguna coloración. En la Figura 3a puede verse además que las mucosas de colon normales residuales no muestran ninguna reactividad con el anticuerpo. La coloración antagonista de las secciones se efectuó con hematoxilina. La reactividad positiva en la inmunohistoquímica se confirmó en una selección de los casos mediante RT-PCR también en el plano de la ARN. En tal contexto también los tumores de mama proporcionaban una señal positiva de PCR. Este hallazgo diferente en comparación con el Ejemplo 4 se puede explicar por la utilización de otros cebadores de PCR distintos que en el Ejemplo 4.

Tabla 2

15	Tipo de tumor	Casos positivos/casos ensayados
	Adenocarcinoma de mama	8/8
	Adenocarcinoma de colon	10/11
	Adenocarcinoma de pulmón	7/8
	Carcinoma epitelial plano de pulmón	9/9
20	Adenocarcinoma de páncreas	11/12
	Adenocarcinoma de estómago	9/9

Ejemplo 6

25 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 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 sintetizaron nuevos cebadores dentro de esta secuencia (SEQ ID NO:9 hasta 12). Mediante PCR con diferentes combinaciones

356353

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 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 específico para genes se fija al ADNc (cebador SEQ ID NO:7 ó 9 respectivamente), mientras que el segundo cebador (T_m -53°C, SEQ ID NO:13) se fija primeramente a una temperatura 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 (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 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 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 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 clonación. En el fragmento de ADNc que ahora constaba de 2.216 pb se pudo identificar un cuadro de lectura continuo

357 354

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 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 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 respectivamente 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 7

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

Epítomos potenciales para péptidos dentro de la región
5 codificadora de B99-1 según SEQ ID NO:2 (posiciones de aminoácidos: 1-438; Tabla 3A), la de B99-2 según SEQ ID NO:4 (posiciones de aminoácidos 150-190; Tabla 3B) y la de B99-3 según SEQ ID NO:6 (posiciones de aminoácidos 1-40; Tabla 3C) se realizaron mediante los algoritmos descritos por Parker
10 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-
15 meros, de los cuales es de esperar que se fijen a las correspondientes moléculas de HLA y por lo tanto constituyan epítomos para CTL inmunógenos; los péptidos determinados están enumerados en la Tabla 3. Mediante un modo análogo de proceder se pueden determinar otros potenciales epítomos para péptidos para otros tipos de HLA u otros péptidos 8- y
20 10-meros.

359
356

Tabla 3A

Candidatos a péptidos de B99 inmunógenos (B99-1)

5	Posición inicial en SEQ ID NO:2/ SEQ ID NO:	Secuencia	HLA
10	5	Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu	B14
	12	Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met	A*0201
	12	Tyr Leu Trp Ala Ley Gly Cys Tyr Met Leu	A*0201
	19	Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu	A*0201
15	21	Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu	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
20	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
	187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	A*0201

360 357

5

10

206	Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu	A*0201
209	Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	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

Tabla 3B

Candidatos a péptidos de B99 inmunógenos (B99-2)

5	Posición inicial en SEQ ID NO:4/ SEQ ID NO:		
10	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
15	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

20

362-359

Tabla 3C

Candidatos a péptidos de B99 inmunógenos (B99-3)

5	Posición inicial en SEQ ID NO:6/ SEQ ID NO:		
10	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
15	14	Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val	A*0201
	16	Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met	A*0201

363
360

Ejemplo 8

Experimento de estabilización de MHC con péptidos potenciales de fijación al MHC específicos para B99

Péptidos potenciales de fijación al MHC de B99 fueron comprobados en un experimento de carga con péptidos de T2 en cuanto a su capacidad para estabilizar moléculas de HLA-A2 sobre la superficie de células T2, lo cual constituye una indicación en cuanto a su capacidad de fijación al MHC. El experimento se llevó a cabo tal como ha sido descrito por Böhm y colaboradores, 1998. La estabilización se midió mediante un análisis por FACS con anticuerpos específicos para HLA-A2 (BB7.2). Cinco péptidos mostraron un efecto de estabilización cuando se utilizaron en una concentración de 100 µg/ml, representado por un aumento de la intensidad media de fluorescencia en comparación con el testigo sin péptido o con un péptido testigo de MAGE-3 A1, que no muestra ninguna fijación (Tabla 4):

Tabla 4

Péptido	Secuencia	Intensidad media de la fluorescencia
ningún péptido		2,27
testigo negativo MAGE-3 A1	Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr	2,25
B99-12	Tyr Leu Trp Ala Leu Cys Tyr Met Leu	7,46
B99-19	Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu	7,43
B99-21	Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu	3,32
B99-187	Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val	3,57
B99-209	Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val	4,72

364 361

Para el análisis ulterior, estos péptidos se investigaron en una serie de diluciones en el mismo sistema de ensayo, a fin de demostrar una eventual dependencia de la fijación con respecto de la concentración. La Figura 4 muestra la estabilización de MHC en células T2 mediante diferentes concentraciones de péptidos de B99. Especialmente los péptidos de B99-19, B99-187 y B99-209 demuestran una manifiesta dependencia con respecto de la concentración de la estabilización de MHC, por lo cual estos péptidos son candidatos preferidos para estrategias de inmunización. Como testigo positivo se utilizó tirosinasa y como testigo negativo el péptido MAGE-3 específico para HLA-A1.

Bibliografía

- 5 Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga,
J., y Knop, J. (1997), *J. Immunol. Methods* 203,
171-180.
- 10 Blake, J., Johnston, J.V., Hellström, K.E., Marquardt,
H., y Chen, L. (1996), *J. Exp. Med.* 184,
121-130.
- 15 C. M. Böhm, M. L. Hanski, S. Stefanovic, H. G.
Rammensee, H. Stein, J. Taylor-Papadimitriou, E. O.
Riecken, y C. Hanski. *Int.J.Cancer* 1998.Mar.2.
75:688-693
- 20 Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der
Bruggen, y A. Van Pel (1994), *Annu.Rev.Immunol.*
12: 337-365
- 25 Boon T , (1998). Tumor antigens recognized by cytolytic
T cells. Cancer Vaccine Week - Interantional
Symposium, New York, Oct 1998; abstract S01
- Boulianne, G. L., et al., (1984), *Nature* 312: 643-646
- 30 Brüggemann, M. y Neuberger, M.S., (1996), *Immunol.*
Today 17: 391-397
- 35 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 y Falo, LD, Jr. (1998), J. Immunol. 160:
3081-3085
- 5 Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure,
A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E.,
Pfreundschuh, M., y Old, L.J. (1997), Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. A. 94, 1914-1918.
- 10 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, y
15 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., y Siebert, P.D.
20 (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6025-
6030.
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P.,
25 Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H.,
Pardoll, D., y Mulligan, R. (1993), Proc. Natl.
Acad. Sci. U. S. A 90: 3539-3543.
- 30 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.
35

368 364

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.

5

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

10

Gaudi C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F (1999),
J Immunol 162:1730-1738

15

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

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

20

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

25

Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SBC, Lekstrom KJ, Deacon DD,
Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Slingluff CL,
Ross MM (1998), Cancer Res 58:5144-5150

30

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

35

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., y Knuth, A.
(1998), J. Exp. Med. 187, 265-270.

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

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

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

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

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

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

Kruif, J., et al., (1995), Proc. Natl. Acad. Sci.
25 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
- 5
- Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der
Bruggen P (1997) , J Exp Med 186:785-793
- 10 Marchand M, Weynants P, Rankin E et al (1995), Int. J.
Cancer 63:883-885
- Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel,
L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J.,
15 Ildstad, S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., y Lotze,
M.T. (1995), Nature Medicine 1, 1297-1302.
- McGuinness, B.T., et al., (1996), Nature Biotechnol. 14,
20 1149
- Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), Curr.
Opin. Immunol. 8:651-657
- 25
- 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
30
- Pardoll, D. M. (1998) Nature Medicine 4: 525-531
- Parker, K. C., M. A. Bednarek, y J. E. Coligan.
35 (1994), J. Immunol. 152:163.

~~370~~
367

- 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.
- 5 Paterson Y, Ikonomidis G (1996), Curr. Opin. Immunol.
5: 664-9
- 10 Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995),
Immunogenetics 41:178-228
- Rapellino, M, Pecchio, F, Baldi, S, Scappaticci, E, y
Cavallo, A (1995), Anticancer Res. 15: 1065-1070
- 15 Ravaioli, A., Bagli, L., Zucchini, A., y Monti, F.
(1998), Cell. Prolif. 31, 113-126
- 20 Revillion, F, Bonnetterre, J, y Peyrat, JP (1998),
Eur. J. Cancer 34: 791-808
- Restifo NP (1996), Curr. Opin. Immunol. 5: 658-63
- 25 Riechmann, L., et al., (1988), Nature 332: 323-327
- Robbins, PF y Kawakami, Y (1996), Curr. Opin.
Immunol. 8: 628-636
- 30 Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey,
H.M., y Sette, A. (1993), Cell 74, 929-937.
- 35 Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B.,
Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G.,

37+ 368

Schobert, I., y Pfreundschuh, M. (1995), Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11810-11813

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

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

15 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

20 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.,
25 Grey, H.M., y Chisari, F.V. (1994), J. Immunol.
153, 5586-5592.

30 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.

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

372
369

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

5 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

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

15 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

20 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

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

30 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. In: Immunology of human melanoma.
Tumor-host interaction and immunotherapy, compilado
por M. Maio, Amsterdam, IOS, 1996, p. 165-173

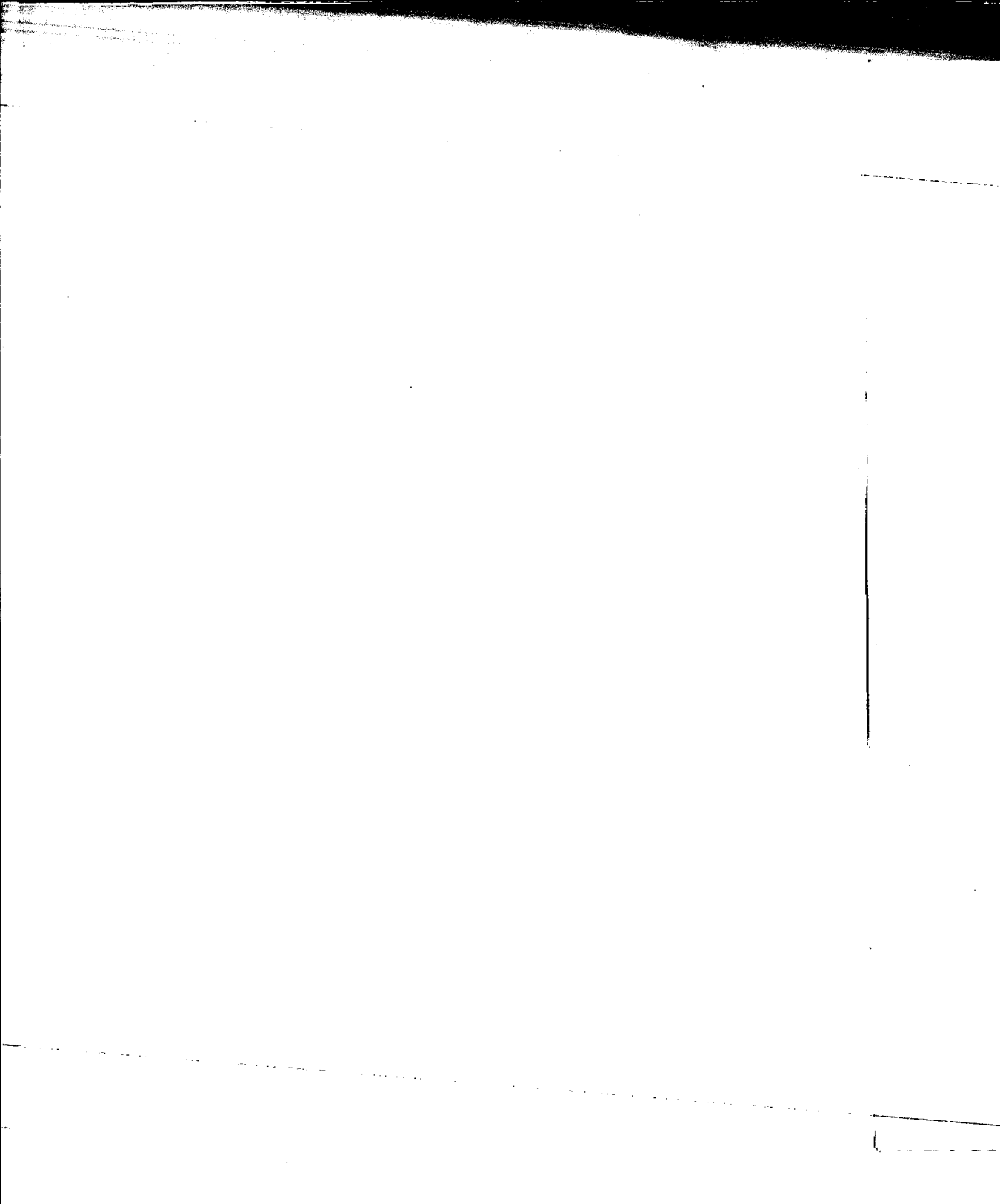
35

- van Elsas, A., Aarnoudse, C., van der Minne, C.E., van
der Spek, C.W., Brouwenstijn, N., Osanto, S., y
Schrier, P.I. (1997), J. Immunother. 20: 343-353.
- 5 Vaughan, T.J., et al., (1998), Nature Biotechnol. 16,
535-539
- Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, y Kinzler,
10 KW (1995), Science 270: 484-487
- Wang, L., et al., (1997), Mol. Immunol. 34: 609-618
- 15 Wang, RF (1997), Mol. Med. 3: 716-731
- Wax, S.D., Rosenfield, C.L., y Taubman, M.B., (1994),
J. Biol. Chem. 269, 13041-13047.
- 20 Wax, S.D., Tsao, L., Lieb, M.E., Fallon, J.T., y
Taubman, M.B. (1996), Lab. Invest. 74, 797-808.
- Winter, G., et al., (1994), Annu. Rev. Immunol. 12,
25 433-455
- Woelfel, T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH,
Rammensee, HG, Rotzschke, O, y Falk, K (1994),
Int. J. Cancer 57: 413-418
- 30 Woelfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C,
Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum
Büschchenfelde KH, Beach D (1995), Science 269:
1281-1284
- 35 Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F.,
Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho,

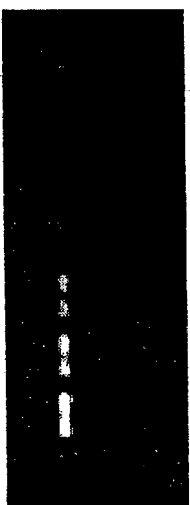
374
371

K.R., August, J.T., y Pardoll, D.M. (1995), Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(25): 11671-11675.

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

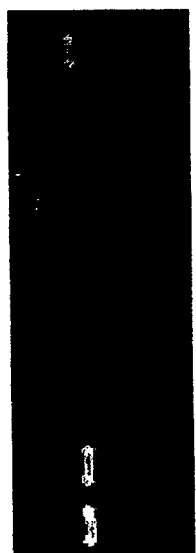


Tumor



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

Normal



Colon
Corazón
Hígado
Pulmón
Bazo
Riñón
Testículos
A549
Testigo +

Fig. 1

25/5
372

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

276
373

Fig. 3

~~377~~

374



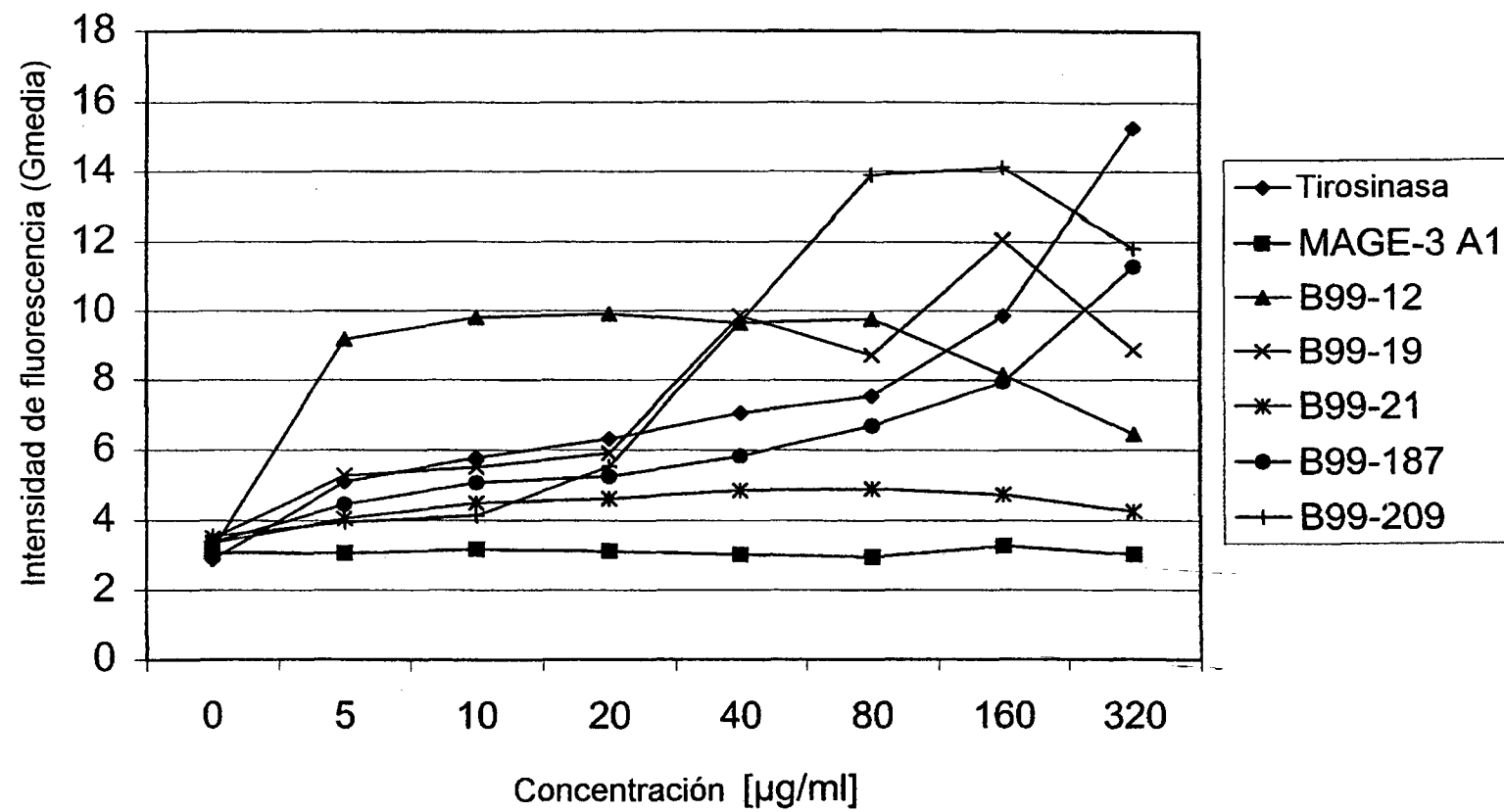


Fig. 4

CS
27

379 376

REIVINDICACIONES

- 1.- Antígeno asociado a tumores con la denominación 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 tumores, definido en la reivindicación 1.
- 3.- (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación 1 o 2, que provoca una respuesta inmunitaria humoral.
- 4.- (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación 1 o 2, cuyo o cuyos producto (s) de degradación es (son) 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.
- 6.- Péptido inmunógeno según la reivindicación 5, seleccionado entre el grupo de péptidos según SEQ ID NO:31, 57 y 59.
- 7.- (Poli) péptido inmunógeno según una de las reivindicaciones 1 a 6 para la inmunoterapia de enfermedades de cáncer *in vivo* o *ex vivo*,

induciendo el (poli)péptido una respuesta inmunitaria contra células de tumores del paciente, que expresan B99.

8.-Composición farmacéutica para la administración por vía parenteral, tópica, oral o local, caracterizada porque como componente activo contiene uno o varios (poli) péptidos inmunógenos según una de las reivindicaciones 1 a 6.

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

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

11.- Composición farmacéutica según la reivindicación 9 o 10, caracterizada porque los péptidos se fijan a por lo menos dos diferentes tipos de HLA.

12.-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.

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

14.- Molécula de ADN según la reivindicación 13, caracterizada porque es un polinucleótido con la secuencia representada en SEQ ID NO:1, 3 ó 5.

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

16.- Molécula de ADN recombinante, que contiene una molécula de ADN según una de las reivindicaciones 12 a 14.

17.- Molécula de ADN según una de las reivindicaciones 12 a 15, 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.

18.- Composición farmacéutica, que contiene como constituyente activo una o varias de las moléculas definidas en una de las reivindicaciones 12 a 16.

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

20.- Anticuerpo contra un (poli)péptido definido en una de las reivindicaciones 1 a 6.

382
379

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

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

COLO 09255-801-021-8

JJC-ID-154

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH et al.
 5 <120> Antígeno asociado a tumores
 <130> seqlist12203
 <140>
 <141>
 <160> 61
 10 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 2216
 <212> DNA
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(426)
 <220>
 <221> CDS
 20 <222> (427)..(1743)
 <220>
 <221> 3'UTR
 <222> (1744)..(2216)
 <400> 1
 25
 GTCAAGGGAA CTGCOCTTGC TACTTGTGAC CTGCOCTTTA CTCAGCAGTT TTTGTCTCTGG 60
 GAAGCOCTGG GATTCTGCTA ATAOCATCA CTGTAGGTGC TGAAGGGAAA CAGATGAAGA 120
 ACATGAOCTC AAGGAGCTTC CTGTCAATGA GAAGACCAAG CTGAOGCTG GCAAAGATAT 180
 30 TAAAGAGGAG OCTGAACTG TTCTTTGGAC ATCTTATGAA TGTCAGAAAA TACCTTTTGG 240
 AGGGTTAGAA GATCAGGGGA CATGGTTGTT CACATTTGCT GCAAGGGAAC AOCGOCAGTC 300
 TTCCTTGGG AACAGATCA CGCTTGTGA AGAGATCATC OCTAAGCAGG AGAGAAGCTA 360
 CTAAAGGATT GTGTACTOCT CCAOCTTCC TGTGCTGGT CTCAOCTGT CTCCATTCT 420
 35 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
 GCT CTG GGC TGC TAT ATG CTG CTG GGC 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	
	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		
5	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			
	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					
	CGA	GAG	OCT	TTC	ACA	GAC	AOC	CAC	TAC	CTC	TOC	CTC	AOC	AGA	GAC	TGT	756
	Arg	Glu	Pro	Phe	Thr	Asp	Thr	His	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Arg	Asp	Cys	
		95				100					105				110		
15	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		
	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			
20	ATT	GAA	AAC	TTT	GAA	AGG	CTA	CTG	CGA	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				
	ATA	TAC	TGT	GTC	CAT	GTG	GAT	GAG	AAG	TOC	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						
25	GCG	GTC	AAA	GCA	ATT	ATT	TCT	TGC	TTC	CCA	AAT	GTC	TTC	ATA	GOC	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	CGG	GTG	GTT	TAT	GOC	TOC	TGG	TOC	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			
30	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	
				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				
35	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					

	GAG GTA CCT OCT AAG CAC AAA GAA ACC CGC TGG AAA TAT CAC TTT GAG Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr His Phe Glu 255 260 265 270	1236
5	GTA GTG AGA GAC ACA TTA CAC CTA ACC AAC AAG AAG AAG GAT OCT CCC Val Val Arg Asp Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys Asp Pro Pro 275 280 285	1284
	OCT TAT AAT TTA ACT ATG TTT ACA GGG AAT GCG TAC ATT GTG GCT TCC Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Ala Ser 290 295 300	1332
10	CGA GAT TTC GTC CAA CAT GTT TTG AAG AAC OCT AAA TCC CAA CAA CTG Arg Asp Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser Gln Gln Leu 305 310 315	1380
	ATT GAA TGG GTA AAA GAC ACT TAT AGC CCA GAT GAA CAC CTC TGG GGC Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His Leu Trp Ala 320 325 330	1428
15	ACC CTT CAG CGT GCA CGG TGG ATG CCT GGC TCT GTT CCC AAC CAC CCC Thr Leu Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro Asn His Pro 335 340 345 350	1476
	AAG TAC GAC ATC TCA GAC ATG ACT TCT ATT GGC AGG CTG GTC AAG TGG Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg Leu Val Lys Trp 355 360 365	1524
20	CAG GGT CAT GAG GGA GAC ATC GAT AAG GGT GCT OCT TAT GCT CCC TGC Gln Gly His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro Tyr Ala Pro Cys 370 375 380	1572
	TCT GGA ATC CAC CAG CGG GCT ATC TGC GTT TAT GGG GCT GGG GAC TTG Ser Gly Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala Gly Asp Leu 385 390 395	1620
25	AAT TGG ATG CTT CAA AAC CAT CAC CTG TTG GGC AAC AAG TTT GAC CCA Asn Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro 400 405 410	1668
	AAG GTA GAT GAT AAT GCT CTT CAG TGC TTA GAA GAA TAC CTA CGT TAT Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr 415 420 425 430	1716
30	AAG GGC ATC TAT GGG ACT GAA CTT TGA GACACACTAT GAGAGOGTTG Lys Ala Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *	1763
	CTAOCCTGTGG GGCAAGAGCA TGTACAAACA TGCTCAGAAC TTGCTGGGAC AGTGTGGGTG	1823
	GGAGAACAGG GCTTTGCAAT TCGTGGCATC CTTTAGGATA AGAGGGCTGC TATTAGATTG	1883
	TGGGTAAGTA GATCTTTTGC CTTGCAAATT GCTGCTGGG TGAATGCTGC TTGTTCTOCC	1943
35	ACCOCTAACC CTAGTAGTTC CTCCTAATC TTCTCACTA AGTGAGAATG AGAACTGCTG	2003
	TGATAGGGAG AGTGAAGGAG GGATATGTGG TAGAGCACTT GATTTCAGTT GAATGCCTGC	2063

386.383

TGGTAGCTTT TOCATTCTGT GGAGCTGCGG TTCTTAATAA TTCCAGGTTT GGTAGCGTGG 2123
 AGGAGAACTT TGATGGAAAG AGAACCTTCC CTTCTGTACT GTTAACTTAA AAATAAATAG 2183
 CTCTGATTC AAAGTAAAAA AAAAAAAAAA AAA 2216

5

<210> 2
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

10

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 25 30

15

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

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
 65 70 75 80

20

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
 100 105 110

Phe Lys Ala Glu Arg Lys Phe Ile Gln Phe Pro Leu Ser Lys Glu Glu
 115 120 125

25

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

30

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
 180 185 190

Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val Gln Ala Asp Leu Asn
 195 200 205

35

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

387
384

Asn Thr Cys Gly Thr Asp Phe Pro Ile Lys Ser Asn Ala Glu Met Val
 225 230 235 240
 Gln Ala Leu Lys Met Leu Asn Gly Arg Asn Ser Met Glu Ser Glu Val
 245 250 255
 5 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
 Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Ala Ser Arg Asp
 290 295 300
 10 Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys Ser Gln Gln Leu Ile Glu
 305 310 315 320
 Trp Val Lys Asp Thr Tyr Ser Pro Asp Glu His Leu Trp Ala Thr Leu
 325 330 335
 Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val Pro Asn His Pro Lys Tyr
 15 340 345 350
 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
 370 375 380
 20 Ile His Gln Arg Ala Ile Cys Val Tyr Gly Ala Gly Asp Leu Asn Trp
 385 390 395 400
 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
 25 Ile Tyr Gly Thr Glu Leu *
 435
 <210> 3
 <211> 2217
 30 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(426)
 <220>
 35 <221> CDS
 <222> (427)..(999)
 <220>

388 385

<221> 3'UTR
<222> (1000)..(2217)

<220>
<221> 5'UTR
5 <222> (1)..(844)

<220>
<221> CDS
<222> (845)..(1744)

<220>
10 <221> 3'UTR
<222> (1745)..(2217)

<400> 3

	GTCACGGGAA CTGCCCTTGC TACTTGTGAC CTGCCCTTTA CTCAGCAGTT TTTGTTCTGG	60
15	GAAGCCCTGG GATTCTGCTA ATAACATCA CTGTAGGTGC TGAAGGGAAA CAGATGAAGA	120
	ACATGAACCTC AAGGAGCTTC CTGTCAATGA GAAGACCAAG CTGAAGGCTG GCAAAGATAT	180
	TAAAGAGGAG CCTGAAACTG TTCTTGGAC ATCTTATGAA TGTCAGAAAA TAACCTTTTGG	240
	AGGGTTAGAA GATCAGGGGA CATGGTTGTT CACATTGCT GCCACGGAAC ACGGOCAGTC	300
20	TTCACTTGGG AACAGAATCA CGCCTTGTGA AGAGATCATC OCTAAGCAGG AGAGAAGCTA	360
	CTAAAGGATT GTGTACTOCT CCACTTCCC TGTGCTGGT CTCACCTGT CTCOCATTCT	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	
25	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	
	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	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	
	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	
35	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

	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	
	115 120 125	
5	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	
	ATT GAA AAC TTT GAA AGG CTA CTG CGA GCT GTG TAT GCC OCT CAG AAC	900
	Ile Glu Asn Phe Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn	
	145 150 155	
10	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	
	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	
15	TAA GCTGGTTGG GTGGTTTATG CCTCTGGTC CAGGGTGCAA GCTGACCTCA	1049
	*	
	ACTGCATGGA AGACTTGCTC CAGAGCTCAG TGGGTGGAA ATACTTCTG AATACATGTG	1109
	GGACGGACTT TOCTATAAAG AGCAATGCAG AGATGGTOCA GGCTCTCAAG ATGTTGAATG	1169
20	GGAGGAATAG CATGGAGTCA GAGGTACCTC CTAAGCACAA AGAAACCCGC TGGAAATATC	1229
	ACTTTGAGGT AGTGAGAGAC ACATTACACC TAAOCAACAA GAAGAAGGAT OCTCCCCCTT	1289
	ATAATTTAAC TATGTTTACA GGAATGGT ACATTGTGGC TTCCCGAGAT TTGCTCAAC	1349
	ATGTTTTGAA GAACCTAAA TOCCAACAAC TGATTGAATG GGTAAAAGAC ACTTATAGCC	1409
25	CAGATGAACA CCTCTGGGOC ACCCTTCAGC GTGCACGGTG GATGCTGGC TCTGTTCCA	1469
	ACCACCCCAA GTACGACATC TCAGACATGA CTTCTATTGC CAGGCTGGTC AAGTGGCAGG	1529
	GTCATGAGGG AGACATCGAT AAGGGTGCTC CTTATGCTOC CTGCTCTGGA ATCACCAGC	1589
	GGGCTATCTG CGTTTATGGG GCTGGGGACT TGAATTGGAT GCTTCAAAAC CATCACTGT	1649
30	TGGCCAACAA GTTTGAOCCA AAGGTAGATG ATAATGCTCT TCAGTGCTTA GAAGAATAOC	1709
	TACGTTATAA GGOCATCTAT GGGACTGAAC TTTGAGACAC ACTATGAGAG CGTTGCTACC	1769
	TGTGGGGCAA GAGCATGTAC AAACATGCTC AGAACTTGCT GGGACAGTGT GGGTGGGAGA	1829
	CCAGGGCTTT GCAATTGGTG GCATCCTTTA GGATAAGAGG GCTGCTATTA GATTGTGGGT	1889
35	AAGTAGATCT TTTGCTTGC AAATTGCTGC CTGGGTGAAT GCTGCTTGT CTCTACCCC	1949
	TAAOCTAGT AGTTCTCCA CTAACCTTCT CACTAAGTGA GAATGAGAAC TGCTGTGATA	2009

390
387

GGGAGAGTGA AGGAGGGATA TGTGGTAGAG CACTTGATTT CAGTTGAATG OCTGCTGGTA 2069
 GCTTTTTCAT TCTGTGGAGC TGOOGTTCT AATAATTOCA GGTTTGGTAG CGTGGAGGAG 2129
 AACTTTGATG GAAAGAGAAC CTTCCTTCT GTACTGTAA CTAAAAATA AATAGCTCT 2189
 5 GATTCAAAGT AAAAAAAAAA AAAAAAA 2217

<210> 4
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 4

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
 15 20 25 30

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

Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu Ser Leu Thr Arg Asp Cys Glu His
 100 105 110

25 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

30 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
 165 170 175

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

35

<210> 5

<211> 2217
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> 5'UTR
<222> (1)..(844)

5

<220>
<221> CDS
<222> (845)..(1744)

<220>
<221> 3'UTR
<222> (1745)..(2217)

10

<400> 5

	GTCACGGGAA CTGCOCTTGC TACTTGTGAC CTGCOCTTTA CTCAGCAGTT TTTGTTCTGG	60
	GAAGCOCTGG GATTCTGCTA ATACCTATCA CTGTAGGTGC TGAAGGGAAA CAGATGAAGA	120
15	ACATGAOCTC AAGGAGCTTC CTGTCAATGA GAAGACCAAG CTGACGCTG GCAAAGATAT	180
	TAAAGAGGAG OCTGAACTG TTOCTTGGAC ATCTTATGAA TGTGAGAAA TACCTTTTGG	240
	AGGGTTAGAA GATCAGGGGA CATGGTTGTT CACATTTGCT GOCAGGAAC ACCGOCAGTC	300
	TTCACCTGGG AACAGAATCA CGOCTTGTGA AGAGATCATC OCTAAGCAGG AGAGAAGCTA	360
20	CTAAAGGATT GTGTACTOCT CCAOCTTOCC TGTGCTGGT CTCCOCTGT CTCCATTTCT	420
	GTGACGATGG TTCAATGGAA GAGACTCTGC CAGCTGCATT ACTTGTGGGC TCTGGGCTGC	480
	TATATGCTGC TGGCCACTGT GGCTCTGAAA CTTTCTTTCA GGTGAAGTG TGACTCTGAC	540
	CACITGGGTC TGGAGTCCAG GGAATCTCAA AGCCAGTACT GTAGGAATAT CTGTATATAT	600
25	TTOCTGAAAC TTCCAGCAA GTGGTCTATC AACTGTTTCA GGGTCACCCG AGGGGACCAA	660
	GAGGCAGTGC TTCAGGCTAT TCTGAATAAC CTGGAGGTCA AGAAGAAGCG AGAGCCTTTC	720
	ACAGACACCC ACTACCTCTC OCTCACCAGA GACTGTGAGC ACTTCAAGGC TGAAAGGAAG	780
	TTCATACAGT TOCCACTGAG CAAAGAAGAG GTGGAGTTCC CTATTGCATA CTCTATGGTG	840
30	ATTC 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	
	1 5 10 15	
	CCC CTC AGA ACA TAT ACT GTG TCC ATG TGG ATG AAG AAG TCC OCA GAA	937
	Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met Trp Met Lys Lys Ser Pro Glu	
	20 25 30	
35	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	

	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	
	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	
5	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	
	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	
10	100 105 110	
	AGC ATG GAG TCA GAG GTA CCT 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	
	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	
15	130 135 140	
	AAG GAT OCT CCC OCT TAT AAT TTA ACT ATG TTT ACA GGG AAT GOG TAC	1321
	Lys Asp Pro Pro Pro Tyr Asn Leu Thr Met Phe Thr Gly Asn Ala Tyr	
	145 150 155	
	ATT GTG GCT TOC 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	
20	160 165 170 175	
	TOC 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	
	CAC CTC TGG GOC ACC CTT CAG OGT GCA OGG TGG ATG CCT GGC TCT GTT	1465
	His Leu Trp Ala Thr Leu Gln Arg Ala Arg Trp Met Pro Gly Ser Val	
25	195 200 205	
	CCC AAC CAC CCC AAG TAC GAC ATC TCA GAC ATG ACT TCT ATT GOC AGG	1513
	Pro Asn His Pro Lys Tyr Asp Ile Ser Asp Met Thr Ser Ile Ala Arg	
	210 215 220	
	CTG GTC AAG TGG CAG GGT CAT GAG GGA GAC ATC GAT AAG GGT GCT OCT	1561
	Leu Val Lys Trp Gln Gly His Glu Gly Asp Ile Asp Lys Gly Ala Pro	
30	225 230 235	
	TAT GCT CCC TGC TCT GGA ATC CAC CAG OGG GCT ATC TGC GTT TAT GGG	1609
	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	
35	260 265 270	
	AAG TTT GAC CCA AAG GTA GAT GAT AAT GCT CTT CAG TGC TTA GAA GAA	1705

390

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

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

5 GAGAGCGTTG CTACCTGTGG GGCAAGAGCA TGTACAAACA TGCTCAGAAC TTGCTGGGAC 1814
 AGTGIGGGTG GGAGACCAGG GCTTTGCAAT TCGTGGCATC CTTTAGGATA AGAGGGCTGC 1874
 TATTAGATTG TGGGTAAGTA GATCTTTTGC CTTGCAAATT GCTGCTGGG TGAATGCTGC 1934
 TTGTTCTCTC ACCCTAACC CTAGTAGTTC CTCACCTAAC TTTCTCACTA AGTGAGAATG 1994

10 AGAACTGCTG TGATAGGGAG AGTGAAGGAG GGATATGTGG TAGAGCACTT GATTTCAGTT 2054
 GAATGCCTGC TGGTAGCTTT TCCATTCTGT GGAGCTGCGG TTCTAATAA TTCCAGGTTT 2114
 GGTAGCGTGG AGGAGAACTT TGATGGAAAG AGAACCTTCC CTTCTGTACT GTTAACTTAA 2174
 AAATAAATAG CTCTGATTC AAAGTAAAAA AAAAAAAAAA AAA 2217

15

<210> 6
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 6

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
 20 25 30

25 Phe Lys Glu Ala Val Lys Ala Ile Ile Ser Cys Phe Pro Asn Val Phe
 35 40 45

Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val Val Tyr Ala Ser Trp Ser Arg Val
 50 55 60

30 Gln Ala Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val Pro
 65 70 75 80

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
 100 105 110

35 Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys His Lys Glu Thr Arg Trp Lys Tyr
 115 120 125

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

394 391

	130		135		140											
	Asp	Pro	Pro	Pro	Tyr	Asn	Leu	Thr	Met	Phe	Thr	Gly	Asn	Ala	Tyr	Ile
	145				150						155					160
5	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
				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
	Ala	Pro	Cys	Ser	Gly	Ile	His	Gln	Arg	Ala	Ile	Cys	Val	Tyr	Gly	Ala
					245					250					255	
15	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	
20	Leu	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ile	Tyr	Gly	Thr	Glu	Leu	*				
				290						295					300	
	 <210> 7 <211> 25 <212> PRT <213> Homo sapiens															
25																
	<400> 7															
	TCAATGAGAA GACCAAGCTG ACGCC															
30	<210> 8 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial															
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador															
35																
	<400> 8															
	GGGAGACAGG TGGAGACCGA GC															

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 9

TCACGGGAAC TGCCCTTGCT ACTTGT 26

10
<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 10

GCTCCTTGAG GTCATGTTCT TCATCTG 27

20
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

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

25
<400> 11

GGAGACCGAG CACAGGGAAG G 21

30
<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

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

35
<400> 12

CCTTCCCTGT GCTCGGTCTC C

5 <210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

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

<400> 13
10 TCGAGTCGAC TATATGTACC 20

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
15 <213> Secuencia artificial

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

<400> 14
20 AAGGTGAAGG TCGGAGTCAA CG 22

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
25 <213> Secuencia artificial

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

<400> 15
30 GGCAGAGATG ATGACCCTTT TGGC 24

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 16

GACCAGGAGG CATAAACCAC CCGAACC

27

5

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

10

<400> 17

TTCCATCAAA GTTCTCCTCC ACGCTACC

28

15

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

20

<400> 18

CATCCAATTC AAGTCCCCAG CCCATAA

28

25

<210> 19

<211> 43

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

30

<400> 19

TGTAGCGTGA AGACGACAGA AAGGGCGTGG TACCGAGCTC GAG

43

35

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 20

AGGGCGTGGT ACCGAGCTCG AG

22

5

<210> 21

<211> 11

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 21

GGCTCGAGCT C

11

15

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 22

Lys Arg Leu Cys Gln Leu His Tyr Leu

1

5

25

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met

1

5

30

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 24

Ile Leu Asn Asn Leu Glu Val Lys Lys

399 396

1

5

5 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Val Lys Lys Lys Arg Glu Pro Phe
 1 5

10

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 26

Arg Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr
 1 5

20

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

25

Glu Pro Phe Thr Asp Thr His Tyr Leu
 1 5

30

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Phe
 1 5

35

<210> 29
 <211> 9

~~400~~ 397

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

5 Glu Glu Val Glu Phe Pro Ile Ala Tyr
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Arg Leu Leu Arg Ala Val Tyr Ala
1 5

15

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 31

Phe Ile Ala Ser Lys Leu Val Arg Val
1 5

25 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

30 Asp Leu Asn Cys Met Glu Asp Leu Leu
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 33

401 398

Ser Met Glu Ser Glu Val Pro Pro Lys
1 5

5 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

10 Thr Leu His Leu Thr Asn Lys Lys Lys
1 5

15 <210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Phe Val Gln His Val Leu Lys Asn Pro Lys
1 5 10

20 <210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 36

Leu Ile Glu Trp Val Lys Asp Thr Tyr
1 5

30 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

35 Trp Met Leu Gln Asn His His Leu Leu
1 5

<210> 38

402 399

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

<400> 38

5

Leu Leu Ala Asn Lys Phe Asp Pro Lys
 1 5

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 39

Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu
 1 5

15

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 40

Gln Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr
 1 5

25

<210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

30

Cys Leu Glu Glu Tyr Leu Arg Tyr Lys
 1 5

<210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 42

~~403~~

Ala Val Tyr Ala Pro Gln Asn Ile Tyr
1 5

5 <210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

15 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Tyr Cys Val His Val Asp Glu Glu Val
1 5

20 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 45

His Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn
1 5

30 <210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

35 Val Asp Glu Glu Val Pro Arg Asn Phe
1 5

~~404~~

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 47

Phe Gln Arg Gly Gly Gln Ser Asn Tyr
 1 5

10 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

15 Gln Ser Asn Tyr Phe Leu Leu Pro Lys
 1 5

20 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Leu Leu Pro Lys Cys Leu His Ser Gln
 1 5

25 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 50

Arg Arg Leu Lys Thr Leu Lys Gly Tyr
 1 5

35 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

405

<400> 51

Lys Thr Leu Lys Gly Tyr Cys Glu Leu
 1 5

5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

10

Tyr Cys Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 53

Glu Leu Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr
 1 5

20

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 54

Cys Met Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val
 1 5

30

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

35

Pro Leu Arg Thr Tyr Thr Val Ser Met
 1 5

~~406~~ 403

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 56

Tyr Leu Trp Ala Leu Gly Cys Tyr Met Leu
1 5 10

10 <210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

15 Tyr Met Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 58

Leu Leu Ala Thr Val Ala Leu Lys Leu
1 5

25

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 59

Cys Met Glu Asp Leu Leu Gln Ser Ser Val
1 5 10

35 <210> 60
<211> 9

~~407~~ 404

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

5 Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
1 5

<210> 61
<211> 218
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Asn Lys Phe Asp Pro Lys Val Asp Asp Asn Ala Leu Gln Cys Leu
1 5 10 15
15 Glu Glu Tyr

408 405

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00030397 00000003

Folios: 91

Fecha (AMD): 2000-12-12 17:19:50

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

BO OFICIAL DE CAJA : 74,436
: DICIEMBRE 4 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEBITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	Nº. PAGO	Vr. PAGO
ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOSOTA	050-00110-6	2025227	30,005,500.00

***** CONCEPTO *****

RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEHAS COMERCIALES	60,000.00
	TOTAL :	\$ 60,000.00

SESENTA Y CINCO MIL PESOS

SABLE :

DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio ~~410~~

Radicación no 00-30397

Concepto Técnico no . 441

Clasificación Internacional de Patentes : CO7K14/82, C12N15/11, A61K45/05

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|---|---|
| SI ☒] NO [] | Contiene un resumen de la invención (Art.26-e). |
| SI ☒] NO [] | Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d). |
| SI ☒] NO [] | Contiene la descripción de la invención (Art.26-b). |
| SI ☒] NO [] | NO ES APLICABLE [] Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d) |
| SI ☒] NO [] | Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c). |
| SI [] NO [] | NO ES APLICABLE ☒] Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h). |
| SI [] NO [] | NO ES APLICABLE ☒] Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i). |
| SI ☒] NO [] | La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J). |
| SI ☒] NO [] | La prioridad coincide con la materia reivindicada. |
| SI ☒] NO [] | CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS |

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒] NO [] ver hoja(s) anexa(s)

EXAMINADOR TÉCNICO
202044

Bogotá D. C. Febrero 28 de 2003.

Folio ~~411~~

Concepto técnico no. 441

OBSERVACIONES

- ☐ Anexa el documento mediante el cual reivindica la prioridad No. 19919 225.1 Folios 107-214
- ☐ Anexa la traducción del documento de prioridad No. 19919 225.1 Folios 215-315
- ☐ Anexa los dibujos alucivos a la invención. Folios 375-378
- ☐ Anexa un nuevo capítulo descriptivo. Folios 321-364
- ☐ Anexa un nuevo capítulo reivindicatorio. Folios 379-382

EXAMINADOR TECNICO
202044

Bogotá, Febrero 28 de 2003.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

408

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

416

2003) 03 / 04

Folio ~~412~~

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

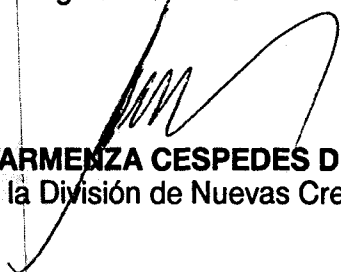
REFERENCIA:	Radicación No.	00-30397
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	420
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase

Dado en Bogotá DC, a los

04 MAR 2003


ALIX GARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202044

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No. 00-030397

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION**
FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **530**, DE
FECHA **31 DE JULIO DE 2003**, EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR LA LEY
EXPIRA EL **28 DE OCTUBRE DE 2003**.

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI ☐ _____

NO ☒ _____

Bogotá D.C., Febrero de 2004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RADICACIÓN: 0-30397

EDICTO No. 3209

LA SECRETARÍA GENERAL AD-HOC HACE SABER:

Que esta Superintendencia profirió **Resolución No. 2431 de 12-FEB-2004**. Que el contenido de la parte resolutive es como sigue: El Superintendente de Industria y Comercio.

RESUELVE

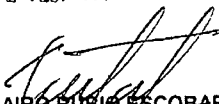
ARTICULO PRIMERO: Declarar abandonada la solicitud de privilegio de patente de invención contenida en el expediente de la referencia.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar personalmente el contenido de la presente resolución al doctor Emilio Ferrero, o a quien haga sus veces, quien actúa como apoderado de Boehringer Ingelheim International GmbH., entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición interpuesto ante el Superintendente de Industria y Comercio, al momento de la notificación o dentro de los 5 días hábiles siguientes a ella.

NOTIFÍQUESE Y CUMPLASE

Dada en Bogotá, D.C., a los 12 FEB. 2004

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,


JAIRO RUBIO ESCOBAR

Carretera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y

Para notificar a los interesados, se fija el presente EDICTO en lugar visible al público en la SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, por el término de (10) diez días hábiles contados a partir de las 8:30 a.m. de hoy.

Secretaría General Ad-Hoc **23-MAR-2004** 

Este edicto se desfija hoy **05-ABR-2004** a las cinco (5:00 p.m.) 

Secretaría General Ad-Hoc

EDICTO No. 3209