

CAVELIER
ABOGADOS

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

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

106 104

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO	
Radicación : 0058185 0000001	Folios: 164
Fecha (AÑO): 2000-08-03 16:38:49	
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLETOS	
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	

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

TRÁMITE: 02 - EVENTO: 01 - ACTUACION: 329

Referencia : Expediente No. 00.058.185
Solicitante : **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH**
Asunto : Solicitud de patente para: **ANTIGENO ASOCIADO CON TUMORES (R11).**
Fecha de solicitud : 2 de agosto de 2000.

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado de la solicitud en referencia, atentamente, presento con este escrito copia certificada de la solicitud de patente alemana número 199 36 563.6 del 4 de Agosto de 1999 junto con la respectiva traducción de su descripción, reivindicaciones y certificaciones, de la cual se reclama prioridad en esta solicitud de patente.

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

Bogotá, 1-3 AGO. 2000
Señora Jefe,


EMILIO FERRERO
T.P.A. No. 31.929

72
COLO: 9255-801-023-4
RCB/mrm-Id-140

NIT. 860.041.367-3



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 36 563.6
Anmeldetag: 4. August 1999
Anmelder/Inhaber: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH, Ingelheim/DE
Bezeichnung: Tumorassoziertes Antigen
IPC: C 07 K, C 12 N, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.**

München, den 27. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoiß

~~107~~ 106

Case 12-211 DI Fa/dc

5

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

10 55216 Ingelheim am Rhein (D)

Titel: Tumorassoziertes Antigen

Die Erfindung bezieht sich auf die Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 anzutreffen ist.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem zunächst mittels RDA

25 („representational difference analysis“) zwischen einer von einem Pankreas Carcinom Patienten abgeleiteten Zelllinie und einem Pool von 11 verschiedenen Normalgeweben eine cDNA-Subtraktionsbibliothek hergestellt wurde. Zur Generierung der für die

30 subtraktive Hybridisierung notwendigen cDNA-Fragmente von „tester“ und „driver“ wurde in Abweichung vom

ursprünglichen Protokoll (Diatchenko et al., 1996) eine Mischung von 6 verschiedenen Restriktionsenzymen eingesetzt. Die Verwendung einer Mischung verschiedener Restriktionsenzyme, die 6 Basenpaare als

5 Erkennungssequenz benötigen, hat gegenüber dem ursprünglichen Protokoll (Diatchenko et al., 1996) folgende Vorteile: a) durch Auswahl von jeweils zwei Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenzen durch 6-er Kombination der Basen A/T (z.B. Ssp I: AATATT) oder

10 C/G (z.B. Nae I: GCCGGC) oder A/C/G/T (z.B. EcoR V: GATATC) dargestellt sind, werden sowohl GC- als auch AT-reiche Regionen eines Gens gleichermaßen geschnitten, wodurch eine homogene Repräsentanz der gesamten Genregion als Restriktionsfragmente ermöglicht

15 wird; b) weiters ist es dadurch möglich, im statistischen Mittel größere cDNA-Fragmente des Kandidatengens zu erhalten (ca. 800 bp), was wiederum bei der nachfolgenden Analyse (Sequenzierung und Annotation) und der Klonierung der „full-size“ cDNA von

20 großem Vorteil ist. Im Originalprotokoll (Diatchenko et al., 1996) wurde ein nur 4-Basen erkennendes Restriktionsenzym (Rsa I) eingesetzt, das zu einer mittleren Fragmentlänge von 256 bp führt und spezifisch CG- oder AT-reiche Regionen nicht prozessieren kann. Um

25 der durch die längeren Insert-cDNA-Fragmente veränderten Hybridisierungskinetik gerecht zu werden, wurde das PCR-Protokoll, wie im Beispiel 2, beschrieben geändert.

Zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene

30 wurden zunächst die erhaltenen cDNA-Klone vereinzelt und davon jeweils eine Glycerinstammkultur, eine Plasmidpräparation und eine das Insert darstellende

Sammlung der PCR-Fragmente im 96-Loch-Plattenformat etabliert. Zunächst wurden 50 zufällig ausgewählte cDNA-Fragmente der 3450 Klone der subtraktiven cDNA-Bibliothek des Pankreas Karzinoms zur Selektion der im Tumor überexprimierten Antigene sequenziert und mit in Datenbanken verfügbaren Sequenzen verglichen. Unter den dabei annotierten Genen befanden sich 12 unbekannte, zu denen ESTs („expressed sequence tags“)-Einträge in der Datenbank existierten. Ein Klon, R11, wies durch seine bevorzugte Präsenz in fötalen Geweben ein im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als TAA geeignetes EST-Profil auf. Weitere Untersuchungen mittels semi-quantitativer RT-PCR und Northern Blot Analyse bestätigten die bevorzugte Expression in verschiedenen Tumor- (Mamma-, Nierenzell- und Pankreaskarzinom) sowie immunprivilegierten Geweben (Testis, Plazenta und Nebenniere) und keine oder eine geringe Expression in Normalgeweben. Weiters ist aus den durch Northern Blot Experimente gewonnenen Daten zu schließen, daß das R11-Transkript eine Länge von ca. 7,5 kb hat und möglicherweise in der Nebenniere Splicevarianten oder homologe Gene existieren.

Die humane R11-cDNA wurde aus Testis kloniert, die erhaltene Sequenz ist in SEQ ID NO:1 dargestellt. Die Sequenz von R11 zeigt sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene keine Identität oder Homologie zu einem bekannten Gen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung erhaltene R11-cDNA weist einen für 356 Aminosäuren kodierenden durchgehenden Leserahmen auf, von dem aufgrund der erhaltenen Ergebnisse anzunehmen ist, daß er den C-terminalen Abschnitt des vollständigen R11-Antigens repräsentiert. Die im Zuge

der vorliegenden Erfindung klonierte R11-cDNA weist eine Länge von 5714 bp auf, wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA in diesem Bereich spricht.

- 5 Aufgrund der im Rahmen vorliegenden Erfindung erhaltenen Daten kann nicht ausgeschlossen werden, daß 5' von der sequenzierten cDNA ein weiteres ATG vorliegt, das das Start-ATG darstellt; in diesem Fall kodiert die vorliegende cDNA für den C-terminalen
- 10 Abschnitt von R11. Informationen über das 5'-Ende und eine gegebenenfalls weiter stromaufwärts liegende kodierende DNA-Sequenz können durch molekularbiologische Standardmethoden gewonnen werden, z.B. mittels 5'-RACE („rapid amplification of cDNA
- 15 ends“). Bei dieser Methode wird RNA, vorzugsweise mRNA, aus Zellen oder Geweben, in denen R11 transkribiert wird (z.B. Mamma-, Nierenzell- oder Pankreaskarzinomgewebe) revers transkribiert und anschließend mit einem Adaptor bekannter Sequenz
- 20 ligiert. Eine PCR mit einem Adaptorprimer (bindet spezifisch an den Adaptor am 5'-Ende der cDNA) und einem R11-spezifischen Primer (z.B. SEQ ID NO: 25) erlaubt die Amplifikation entsprechender R11-Fragmente. Diese PCR-Produkte können, wie in Beispiel 6
- 25 beschrieben, nach Standardmethoden kloniert und, insbesondere durch DNA Sequenzierung, charakterisiert werden.

- Eine alternative Methode zur Charakterisierung des 5'-Endes ist das Screenen von cDNA-Bibliotheken durch
- 30 Hybridisierung mit für R11 spezifischen DNA-Sonden oder

die Analyse von cDNA-Expressions Bibliotheken mit Antiseren.

Führt das Screenen von cDNA-Bibliotheken aufgrund methodisch bedingter Beschränkungen, z.B. ineffiziente reverse Transkription, bedingt durch ausgeprägte Sekundärstrukturen der RNA, nicht zum gewünschten Ziel, können genomische Bibliotheken untersucht werden, indem z.B., wie beim Screenen von cDNA-Bibliotheken, durch Hybridisierung mit für R11 spezifischen DNA-Sonden Klone isoliert werden können, die die stromaufwärts vom erhaltenen 5'-Ende der cDNA liegende Sequenzinformation z.B. die Promotorregion von R11 enthalten.

Im Zuge der vollständigen Klonierung der R11-cDNA kann festgestellt werden, ob der im Bereich des vorliegenden cDNA-Abschnitts erhaltene offene Leserahmen eine Fortsetzung im 5'-Bereich aufweist und/oder ob alternative Leserahmen vorliegen.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte cDNA weist die in SEQ ID NO:1 angegebene Nukleotidsequenz auf; es ist anzunehmen (vgl. oben), daß sie für den C-terminalen Abschnitt des tumorassoziierten Antigens (TAA) der Bezeichnung R11 kodiert.

Ein von der isolierten cDNA exprimiertes Protein weist die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz auf.

Die Erfindung betrifft somit in einem ersten Aspekt ein tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung R11, das die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz aufweist.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung R11, das die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz als Teilsequenz enthält (dies trifft
5 für den Fall zu, daß in 5'-Richtung eine Verlängerung des vorliegenden offenen Leserahmens vorliegt).

Bei dem Protein mit der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Sequenz handelt es sich um ein Produkt, das von einem ca. 7,5 kb großen Transkripts translatiert ist, bzw.
10 das von den Transkripten einer Größe von ca. 3,8 kb und 2,3 kb translatiert ist, das von Spleißvarianten des 7,5 kb Transkripts, wie sie im Gewebe der Nebenniere anzutreffen sind oder von Transkripten der dazu homologen Gene abgeleitet sind.

15 Die in SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann Abweichungen aufweisen, z.B. solche, die durch Austausch von Aminosäuren bedingt sind, sofern das R11-Derivat die für die Anwendung in einer Tumorstoffvakzine erwünschten immunogenen Eigenschaften aufweist.

20 Die natürliche Aminosäuresequenz von R11 kann gegebenenfalls modifiziert sein, indem einzelne Aminosäuren in einem R11 CTL-Epitop ausgetauscht werden, um, im Vergleich zum natürlichen R11 CTL-Epitop, eine Steigerung der Affinität von R11-Peptiden
25 zu MHC-I-Molekülen und damit eine erhöhte Immunogenität und letztlich eine verstärkte Reaktivität gegenüber Tumoren zu bewirken. Modifikationen im Bereich der R11-Epitope können am R11-Gesamtprotein (dieses wird von den APCs zu den entsprechenden Peptiden

prozessiert) bzw. an größeren R11-Proteinfragmenten oder an R11-Peptiden (vgl. unten) vorgenommen werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung immunogene Fragmente und Peptide, die von R11 abgeleitet sind. Letztere werden im folgenden als "R11-Peptide" bezeichnet. Eine erste Gruppe sind R11-Peptide, die eine humorale Immunantwort (Induktion von Antikörpern) auslösen. Derartige Peptide sind ausgewählte Abschnitte von R11 (mindestens 12 bis 15 Aminosäuren), die mittels sogenannter Vorhersage-Algorithmen ("prediction algorithms") wie z.B. dem "surface probability blot" (Emini et al., 1985), dem "hydrophobicity blot" (Kyte and Doolittle, 1982) und dem "antigenic index" (Jameson and Wolf, 1988) ermittelt werden können.

Miteingeschlossen sind auch all jene Peptide, die aus dem gegebenenfalls im Zuge der weiteren Klonierung erhaltenen N-terminalen Bereich von R11 abgeleitet sind.

Es ist bekannt, daß tumorassoziierte Antigene tumorspezifische Mutationen aufweisen können, die zu einer immunologischen Unterscheidung zwischen Tumor und Normalgewebe beitragen (Mandrizzato et al., 1997; Hogan et al., 1998; Gaudi et al., 1999; Wölfel et al., 1995). Um das Vorhandensein tumorspezifischer R11-Mutationen festzustellen, wird, zweckmäßig mit Hilfe von Sonden aus der erfindungsgemäßen, aus Testis isolierten cDNA, die R11-cDNA aus einem oder mehreren unterschiedlichen Tumoren kloniert und die erhaltenen Sequenzen mit Normalgewebs-R11-cDNA verglichen. Es ist zu erwarten, daß Tumor-R11-Peptide aus einem gegenüber Normalgewebs-

R11 mutierten Sequenzabschnitt im Vergleich zu Normalgewebs-R11-Peptiden aus dem entsprechenden Abschnitt eine verstärkte Immunogenität aufweisen. Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren
5 Aspekt R11-Peptide, abgeleitet von Bereichen eines tumorexprimierten R11, die tumorspezifische Mutationen aufweisen.

Bei der therapeutischen Anwendung werden R11-Peptide direkt oder in modifizierter Form (z.B. an KLH =
10 "keyhole limpet hemocyanine" gekoppelt) verabreicht und die Bildung von Antikörpern mittels gängiger immunologischer Assays, z.B. mittels ELISA, bestimmt.

Weitere, im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugte, R11-Peptide sind diejenigen, die durch
15 MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort bewirken. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, nämlich MHC-I-Moleküle, die von CD8-positiven CTLs und MHC-II-Moleküle, die von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt werden.

20 Damit ein Peptid eine zelluläre Immunantwort auslöst, muß es an ein MHC-Molekül binden, wobei der zu behandelnde Patient das MHC-Molekül in seinem Repertoire aufweisen muß. Die Bestimmung des MHC-Subtyps des Patienten stellt somit, im Hinblick auf die Auslösung
25 einer zellulären Immunantwort, eine der wesentlichen Voraussetzungen für die wirksame Anwendung eines Peptids an diesem Patienten dar.

Die Sequenz eines therapeutisch einzusetzenden R11-Peptids wird durch das jeweilige MHC-Molekül
30 hinsichtlich Ankeraminosäuren und Länge vorgegeben.

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

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

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

Die allelspezifischen Anforderungen jedes MHC-I Allel-Produkts an ein Peptid, das an das MHC-Molekül bindet und von diesem präsentiert wird, wurden als Motiv zusammengefaßt (z.B. Falk et al., 1991). Bisher ist eine große Anzahl sowohl von MHC-Peptid-Motiven als auch von MHC-Liganden bekannt. Eine im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Suche nach Epitopen eines bekannten Proteins, das in ein bestimmtes MHC-I-Molekül paßt, wurde in einem Übersichtsartikel von Rammensee et al., 1995,

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

Kawakami et al., 1995, angewendet, um auf der Grundlage bekannter HLA-A*0201 Motive gp100 Epitope zu identifizieren.

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

Seit kurzem sind Datenbanken und Vorhersage-Algorithmen
verfügbar, die mit großer Verlässlichkeit die Vorhersage
von Peptid-Epitopen erlauben, die an ein bestimmtes
25 MHC-Molekül binden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden, unter
Verwendung des von Parker et al., 1994 und Rammensee et
al., 1995 beschriebenen Algorithmus, für die
wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1,
30 -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, Kandidaten-Peptide

des C-terminalen Fragments von R11 identifiziert, von denen zu erwarten ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die ermittelten Peptide sind in Tabelle 1
5 aufgelistet. Auf ähnliche Weise können, gegebenenfalls unter Verwendung weiterer Algorithmen, die den unterschiedlichen Charakteristika der Peptide (Hydrophobizität, Ladung, Größe) bzw. Anforderungen an die Peptide, z.B. die 3D-Struktur des HLA-Moleküls,
10 Rechnung tragen, weitere potentielle Peptid-Epitope ermittelt werden; dies gilt auch für Peptid-Epitope anderer HLA-Typen.

Nach Auswahl von R11-Peptid-Kandidaten mit Hilfe der angeführten Methoden wird deren MHC-Bindung mittels
15 Peptidbindungs-Assays getestet. Als nächstes wird die Immunogenität der Peptide mit guten Bindungseigenschaften bestimmt (Stabilität der Peptid-MHC-Wechselwirkung korreliert in den meisten Fällen mit Immunogenität; van der Burg et al., 1996). Um die
20 Immunogenität des ausgewählten Peptids oder Peptid-Äquivalents zu bestimmen, können Methoden, wie z.B. von Sette et al., 1994, beschrieben, in Kombination mit quantitativen MHC-Bindungs-Assays verwendet werden. Alternativ kann die Immunogenität des ausgewählten
25 Peptids über *in vitro* CTL-Induktion mittels bekannter Methoden (wie weiter unten für *ex vivo* CTL-Induktion beschrieben) getestet werden. Das Prinzip der in mehreren Schritten durchgeführten Methode für die Auswahl von Peptiden, die zur Auslösung einer
30 zellulären Immunantwort fähig sind, ist in der WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, beschrieben. Eine allgemeine

Strategie zum Erhalt effizienter immunogener Peptide, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet ist, wurde außerdem von Schweighoffer, 1997, beschrieben.

Statt die Originalpeptide zu verwenden, die in die
5 Bindungsfurche von MHC-I -oder MHC-II-Molekülen passen, also Peptide, die unverändert von R11 abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge Variationen
10 vorgenommen werden, sofern durch diese Variationen die effektive Immunogenität des Peptids, die sich zusammensetzt aus seiner Bindungsaffinität an das MHC-Molekül und seiner Fähigkeit, T-Zell-Rezeptoren zu stimulieren, nicht nur nicht beeinträchtigt ist,
15 sondern vorzugsweise verstärkt wird. In diesem Fall werden also künstliche Peptide oder Peptid-Äquivalente verwendet, die entsprechend den Anforderungen der Bindungsfähigkeit an ein MHC-Molekül entworfen sind.

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

Zunächst werden die Epitope von MHC-I- bzw. MHC-II-Liganden bzw. deren Variation z.B. nach dem von Rammensee et al., 1995, beschriebenen Prinzip
25 vorgenommen. Die Länge des Peptids entspricht im Falle seiner Abstimmung auf MHC-I Moleküle vorzugsweise einer Minimalsequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeramino-säuren.

Gegebenenfalls kann das Peptid auch am C- und/oder am
30 N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung

die Bindungsfähigkeit an das MHC-Molekül nicht beeinträchtigt bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalsequenz zellulär prozessiert werden kann.

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

10 Eine weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Methode zur Auffindung von Peptiden mit stärkerer Immunogenität als die der natürlichen R11-Peptide besteht im Screenen von Peptid-Bibliotheken mit CTLs, die die natürlich auf Tumoren vorkommenden
15 R11-Peptide erkennen, wie von Blake et al., 1996, beschrieben; in diesem Zusammenhang wird die Verwendung kombinatorischer Peptid-Bibliotheken vorgeschlagen, um Moleküle zu entwerfen, welche von MHC-I-restringierten CTLs erkannte Tumorepitope nachahmen.

20 Das R11-Polypeptid der vorliegenden Erfindung oder davon abgeleitete immunogene Fragmente oder Peptide können rekombinant oder mittels Peptid-Synthese hergestellt werden, wie in der WO 96/10413 beschrieben, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Für
25 die rekombinante Herstellung wird das entsprechende DNA-Molekül nach Standardmethoden in einen Expressionsvektor eingefügt, in eine geeignete Wirtszelle transfiziert, der Wirt unter geeigneten Expressionsbedingungen kultiviert und das Protein
30 gereinigt. Für die chemische Synthese von R11-Peptiden

120
127
können herkömmliche Methoden verwendet werden, z.B. im Handel erhältliche automatische Peptid-Synthesizer.

Alternativ zu natürlichen R11-Peptiden oder heteroclitischen Peptiden können Substanzen, die solche Peptide vortäuschen, z.B. "Peptidomimetica" oder "retro-inverse-Peptide", verwendet werden. Zur Testung dieser Moleküle im Hinblick auf die therapeutische Verwendbarkeit in einer Tumorstoffimpfung werden dieselben Methoden angewendet wie oben für die natürlichen R11-Peptide oder R11-Peptidäquivalente.

Das TAA der Bezeichnung R11 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente, Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z.B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von R11-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Mamma-, Nierenzell- und Pankreaskarzinom.

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

Für die *in vivo* Induktion von CTLs wird eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend als wirksame Komponente das TAA R11 bzw. davon abgeleitete Fragmente oder Peptid(e), einem Patienten verabreicht, der an einer mit dem TAA assoziierten Tumorerkrankung leidet, wobei die Menge an TAA(Peptid) ausreichen muß, um eine wirksame CTL-Antwort auf den Antigen-tragenden Tumor zu erzielen.

Die Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt eine pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung. Vorzugsweise dient die Zusammensetzung der parenteralen Verabreichung, z.B. für die subkutane, intradermale oder intramuskuläre Anwendung. Die R11-TAA/Peptide sind in einem pharmazeutisch annehmbaren, vorzugsweise wässrigen, Träger gelöst oder suspendiert. Die Zusammensetzung kann außerdem übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, etc. enthalten. Die R11-TAA/Peptide können allein oder in Kombination mit Adjuvantien, z.B. inkomplettem Freund's Adjuvans, Saponinen, Aluminiumsalzen oder, in einer bevorzugten Ausführungsform, Polykationen wie Polyarginin oder Polylysin, verwendet werden. Die Peptide können auch an Komponenten, die die CTL-Induktion oder CTL-Aktivierung unterstützen, gebunden werden, z.B. an T-Helferpeptide, Lipide oder Liposomen, oder sie werden gemeinsam mit diesen Substanzen und/oder gemeinsam mit immunstimulierenden Substanzen, z.B. Zytokinen (IL-2, IFN- γ) verabreicht. Methoden und Formulierungen, die zur Herstellung und Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet sind, sind in der WO 95/04542 und WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird, beschrieben.

R11-Fragmente bzw. R11-Peptide können auch verwendet werden, um eine CTL-Antwort ex vivo auszulösen. Eine ex vivo CTL-Antwort auf einen Tumor, der R11 exprimiert, wird induziert, indem man die CTL-Vorläuferzellen zusammen mit APCs und R11-Peptiden bzw R11-Protein inkubiert. Dann läßt man die aktivierten CTLs expandieren, worauf sie dem Patienten wieder verabreicht

131

129

werden. Alternativ können APCs mit R11-Peptiden beladen werden, was zu einer effizienten Aktivierung zellulärer Immunreaktionen gegen R11 positive Tumoren führen kann (Mayordomo et al., 1995; Zitvogel et al., 1996). Eine
5 geeignete Methode um Peptide auf Zellen, z.B. dendritische Zellen, zu laden, wird in der WO 97/19169 geoffenbart.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination mehrerer verschiedener R11-Peptide oder
10 R11-Peptidäquivalente angewendet. In einer weiteren Ausführungsform werden R11-Peptide mit von anderen TAAs abgeleiteten Peptiden kombiniert. Die Auswahl von Peptiden für derartige Kombinationen wird im Hinblick auf die Erfassung unterschiedlicher MHC-Typen getroffen,
15 um eine möglichst breite Patientenpopulation abzudecken, und/oder sie wird auf ein möglichst breites Indikationsspektrum abgestellt, indem Peptide mehrerer unterschiedlicher Tumorantigene kombiniert werden. Die Anzahl der Peptide in einer pharmazeutischen
20 Zusammensetzung kann über einen weiten Bereich schwanken, typischerweise enthält eine klinisch anwendbare Vakzine 1 bis 15, vorzugsweise 3 bis 10 verschiedene Peptide.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch als
25 diagnostische Reagentien eingesetzt werden. Beispielsweise können die Peptide dazu benutzt werden, um das Ansprechen eines Patienten auf die durch das immunogene Peptid hervorgerufene humorale oder zelluläre Immunantwort zu testen. Dadurch besteht die Möglichkeit,
30 ein Behandlungsprotokoll zu verbessern. Beispielsweise kann in Abhängigkeit der Darreichungsform (Peptid,

132

130

- Gesamtprotein oder DNA-Vakzine) des TAA die Zunahme von Vorläufer T-Zellen in den PBLs, die eine Reaktivität gegen das definierte Peptid epitop aufweisen, untersucht werden (Robbins und Kawakami, 1996 sowie darin zitierte
- 5 Referenzen). Außerdem können die Peptide oder das Gesamtprotein bzw. gegen das TAA gerichtete Antikörper dazu verwendet werden, um den Krankheitsverlauf eines R11-positiven Tumors zu charakterisieren (z.B. durch immunhistochemische Analysen von Primärtumor und
- 10 Metastasen). Eine derartige Strategie hat sich schon mehrfach als erfolgreich erwiesen, z.B. der Nachweis des Östrogenrezeptors als Entscheidungsgrundlage zur Endokrintherapie bei Brustkrebs; c-erbB-2 als relevanter Marker bei Prognostik und Therapieverlauf bei Brustkrebs
- 15 (Ravaioli et al., 1998; Revillion et al., 1998); PSMA ("prostate specific membrane antigen") als Marker für Epithelialzellen des Prostatakarzinoms im Serum bzw. durch Einsatz eines ¹¹¹In-markierten monoklonalen Antikörpers gegen PSMA bei der Immunosintigraphie auf
- 20 Prostatakarzinom (Murphy et al., 1998 und inkludierte Referenzen); CEA ("carcinoembryonic antigen") als serologischer Marker für die Prognose und Verlauf bei Patienten des kolorektalen Karzinoms (Jessup und Loda, 1998).
- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt isolierte DNA-Moleküle, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften von R11 oder für Fragmente davon.

- In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende
- 30 Erfindung ein isoliertes DNA-Molekül, das die in SEQ ID NO:1 dargestellte Nukleotidsequenz aufweist bzw.

ein Polynukleotid, das mit diesem DNA-Molekül unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

Unter „stringenten Bedingungen“ wird z.B. verstanden:
 Inkubation über Nacht bei 65°C - 68°C mit 6xSSC (1x
 5 SSC = 150 mM NaCl, 15mM Tri-Natriumcitrat),
 5xDenhardt's Lösung, 0.2%SDS, 50µg/ml Lachsspermien-
 DNA, daran anschließend Waschen zweimal 30 min mit
 2xSSC, 0.1% SDS bei 65°C, einmal 30 min mit 0.2xSSC,
 0.1% SDS bei 65°C und gegebenenfalls abschließendes
 10 Spülen mit 0.1xSSC, 0.1%SDS bei 65°C.

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

Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle bzw. Fragmente davon
 kodieren für (Poly)peptide der Bezeichnung R11,
 bestehend aus oder enthaltend die in SEQ ID NO: 2
 20 dargestellte Aminosäuresequenz, bzw. für davon
 abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide; damit sind
 DNA-Moleküle mitumfaßt, die durch die Degeneration des
 genetischen Codes Abweichungen von der in SEQ ID NO: 1
 dargestellten Sequenz aufweisen.

25 Die Erfindung betrifft auch DNA-Moleküle, die durch
 Mutation zu einem Austausch von Aminosäuren in der in
 SEQ ID NO: 2 dargestellten Proteinsequenz führen,
 sofern sie für ein R11-Derivat bzw. Fragmente oder

Peptide mit den für die Anwendung als Tumorstoffe
erwünschten immunogenen Eigenschaften kodieren.

Die R11-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung oder
die entsprechenden RNAs, die ebenfalls Gegenstand der
5 vorliegenden Erfindung sind, werden, wie die davon
kodierte (Poly)Peptide, für die Immuntherapie von
Krebserkrankungen eingesetzt.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden
DNA-Moleküle, kodierend für natürliche R11-Polypeptide
10 verwendet. Alternativ zur natürlichen R11-cDNA bzw.
Fragmenten davon können modifizierte Derivate verwendet
werden. Diese umfassen Sequenzen mit Modifikationen,
die für ein Protein(fragment) bzw. Peptide mit
stärkerer Immunogenität kodieren, wobei für die
15 Modifikationen auf DNA-Ebene dieselben Überlegungen
gelten wie für die oben beschriebenen Peptide. Eine
weitere Art der Modifikation ist die Aneinanderreihung
zahlreicher Sequenzen, kodierend für immunologisch
relevante Peptide, nach Art einer Perlenschnur
20 ("string-of-beads"; Toes et al., 1997). Die Sequenzen
können auch durch Anfügung von Hilfselementen
modifiziert werden, z.B. Funktionen, die eine
effizientere Abgabe und Prozessierung des Immunogens
gewährleisten (Wu et al., 1995). Beispielsweise kann
25 durch Anfügen einer Lokalisierungssequenz in das
endoplasmatische Retikulum ("ER targeting sequence")
die Prozessierung und damit die Präsentation und
letztlich die Immunogenität des Antigens erhöht werden.

135

133

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein rekombinantes DNA-Molekül, das die R11-DNA enthält.

Die R11-DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung können, vorzugsweise in rekombinanter Form als Plasmide, direkt oder als Bestandteil eines rekombinanten Virus, oder Bakteriums verabreicht werden. Prinzipiell kann jede gentherapeutische Methode für die Immuntherapie von Krebs auf Basis von DNA ("DNA-Vakzine") auf R11-DNA angewendet werden, und zwar sowohl *in vivo* als auch *ex vivo*.

Beispiele für die *in vivo* Verabreichung sind die direkte Injektion von "nackter" DNA, entweder intramuskulär oder mittels Gen-Pistole ("gene gun") von der sich gezeigt hat, daß sie zur Bildung von CTLs gegen Tumorantigene führt. Beispiele für rekombinante Organismen sind Vaccinia Virus, Adenovirus oder *Listeria monocytogenes* (eine Übersicht wurde von Coulie, 1997, gegeben). Desweiteren können synthetische Träger für Nukleinsäuren, wie kationische Lipide, Mikrosphären, Mikrokügelchen oder Liposomen für die *in vivo* Verabreichung von Nukleinsäure-Molekülen, kodierend für R11-Peptid verwendet werden. Ähnlich wie für Peptide können verschiedene Hilfsstoffe, die die Immunantwort verstärken, mitverabreicht werden, z.B. Zytokine, entweder in Form von Proteinen oder dafür kodierenden Plasmiden. Die Applikation kann gegebenenfalls mit physikalischen Methoden, z.B. Elektroporation, kombiniert werden.

Ein Beispiel für die ex vivo Verabreichung ist die Transfektion dendritischer Zellen, wie von Tuting, 1997, beschrieben, oder anderer APCs, die als zelluläre Krebsvakzine zur Anwendung kommen.

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einem weiteren Aspekt die Verwendung von Zellen, die R11 exprimieren, entweder von sich aus oder, in gegebenenfalls modifizierter Form, nach Transfektion mit der entsprechend kodierenden Sequenz, für die
- 10 Herstellung einer Krebsvakzine.

- Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt Antikörper gegen R11 bzw. Fragmente davon. Polyklonale Antikörper können in herkömmlicher Weise durch Immunisierung von Tieren, insbesondere Kaninchen,
- 15 mittels Injektion des Antigens bzw. Fragmenten davon, und anschließender Reinigung des Immunglobulins erhalten werden.

- Monoklonale anti-R11-Antikörper können nach Standardprotokollen gemäß dem von Köhler und Milstein,
- 20 1975, beschriebenen Prinzip gewonnen werden, indem Tiere, insbesondere Mäuse, immunisiert, anschließend antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Tiere immortalisiert werden, z.B. durch Fusion mit Myelomzellen, und der Überstand der erhaltenen
 - 25 Hybridome mittels immunologischer Standard-Assays auf monoklonale anti-R11-Antikörper gescreent wird. Für den therapeutischen oder diagnostischen Einsatz im Menschen können diese tierischen Antikörper gegebenenfalls auf herkömmliche Weise chimierisiert (Neuberger et al.,

1984, Boulianne et al., 1984) oder humanisiert (Riechmann et al., 1988, Graziano et al., 1995) werden.

Humane monoklonale anti-R11-Antikörper(fragmente) können auch von sog. „Phage Display Libraries“ (Winter
5 et al., 1994, Griffiths et al., 1994, Kruif et al., 1995, Mc Guinness et al., 1996) und mittels transgener Tiere (Brüggemann et al., 1996, Jakobovits et al., 1995) gewonnen werden.

Die erfindungsgemäßen anti-R11-Antikörper können in
10 immunhistochemischen Analysen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung von R11-spezifischen Antikörpern, um beliebige Substanzen selektiv zu bzw. in einen Tumor zu
15 bringen, der R11 exprimiert. Beispiele für solche Substanzen sind zytotoxische Agentien oder radioaktive Nuklide, deren Wirkung darin besteht, den Tumor vorort zu schädigen. Aufgrund der tumorspezifischen Expression von R11 sind dabei keine oder nur geringe
20 Nebenwirkungen zu erwarten. In einem weiteren Aspekt können mit Hilfe von R11-Antikörpern Substanzen zur Sichtbarmachung von Tumoren, die R11 exprimieren, herangezogen werden. Dies ist für die Diagnose und die Bewertung des Therapieverlaufs von Nutzen.
25 Therapeutische und diagnostische Anwendungen von Antikörpern, die für anti-R11-Antikörper in Frage kommen, sind in der WO 95/33771 beschrieben.

Das TAA der Bezeichnung R11 gemäß der vorliegenden Erfindung und die davon abgeleiteten Proteinfragmente,
30 Peptide bzw. Peptid-Äquivalente oder Peptidomimetika

können in der Krebstherapie eingesetzt werden, z. B. um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren, die die entsprechenden Antigen-Determinanten exprimieren. Vorzugsweise werden sie für die Therapie von R11-positiven Tumoren verwendet, insbesondere beim Mamma-, Nierenzell- und Pankreaskarzinom.

Figurenübersicht

- 10 Fig. 1: Transkription von R11 in Tumor- und Normalgeweben: Semiquantitative RT-PCR
- Fig. 2: Transkription von R11 in Tumorgewebe und Normalgeweben: Qualitative PCR
- 15 Fig. 3: Northern Blot Analyse von R11 in Normalgeweben
- Fig. 4: Transkription von R11: Qualitative RT-PCR aus RNA von humanen Tumorzelllinien
- Fig. 5: Modifizierte Region des pCR3.1(+)Vektors.

20

Beispiel 1:

Zellkultur der von einem humanen Pankreaskarzinom abgeleiteten Zelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 und Isolierung der poly A⁺ RNA

- 25 Die Zelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 ist von einem humanen Pankreaskarzinom (MZ.PC2) abgeleitet; sie wurde wie folgt erhalten: Zunächst wurden die Tumorzellen einmal

in der Maus passagiert und ein Klon für weitere Studien ausgewählt (MZ.PC 2m7#1). Dieser Klon wurde unter Standardbedingungen (Ausubel et al., 1994) mit einem eukaryontischen Vektor (pEF-BOS; Promotor stammt vom

5 humanen EF-1alpha Gen, Selektionsmarker: Puromycin; Mizushima und Nagata, 1990), der die cDNA des humanen B7.1 Gens (Selvakumar et al., 1992) enthält, transfektiert. Ein Klon MZ-PC2 m7#1 B7.1#3 wurde ausgewählt und in T150 Zellkulturflaschen

10 hochgezüchtet. Als Nährmedium diente RPMI 1640 (Gibco plus 4g/L Glukose) mit 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen durch Trypsinisieren 1:5 zur Propagation gespalten. Nach Erreichen von etwa

15 80% Konfluenz wurden pro T150 Zellkulturflasche 4 ml einer Trypsinlösung (Angaben pro Liter: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,13g Na₂HPO₄-wasserfrei, 0,2g KH₂PO₄, 100ml 2,5% Trypsinlösung, 1g EDTA-Na-Salz; pH7,2-7,4) zum Ernten der Zellen eingesetzt. Insgesamt wurden 2x10⁷

20 Zellen zur Isolierung der RNA nach dem Protokoll des Herstellers (RNeasy Minikit, QIAgen) eingesetzt. Ausgehend von ca. 100 µg total-RNA wurde für die Isolierung von polyA⁺ RNA mittels des Oligotex Kit (QIAgen) entsprechend dem Hersteller-Protokoll

25 vergangen. Im Anschluß daran wurde ausgehend von ca. 0,5 mg polyA⁺ RNA die cDNA Synthese nach Angaben des Herstellers (Clontech Marathon Protokoll) durchgeführt.

Beispiel 2:

30 Repräsentative Differenzanalyse („Representational Difference Analysis“; RDA) der

Pankreaskarzinomzelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 versus
einem Pool von 11 Normalgeweben

- Ausgehend von ca. 0,5 µg poly-A(+) der
Pankreastumorzelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 und einem
5 Pool aus 2,5 µg poly-A(+) RNA von 11 Normalgeweben
(Clontech) Knochenmark, Herz, Niere, Leber, Lunge,
Pankreas, Skelettmuskel, Milz, Thymus, Dünndarm und
Magen wurde die RDA-Studie (Diatchenko et al., ; Hubank
and Schatz,) unter Verwendung des PCR-select™ Kit
10 (Clontech, Palo Alto) entsprechend dem Hersteller-
Protokoll durchgeführt: dabei wurde die RNA der
Pankreastumorzelllinie als „tester“, die des
Normalgewebepools als „driver“ entsprechend dem
Hersteller-Protokoll eingesetzt. Im Gegensatz zum
15 ursprünglichen Protokoll wurde nach der Synthese von
doppelsträngiger cDNA mittels oligo-dT die cDNA mit
6 Restriktionsenzymen: *EcoRV*, *NaeI*, *NruI*, *ScaI*
(Promega), *SspI*, *StuI* (TaKaRa) in Promega Puffer A 2
Stunden bei 37°C und nach Erhöhung der NaCl
20 Konzentration auf 150 mM weitere 2 Stunden bei 37°C
geschnitten. Der Einsatz dieser Mischung von
6 verschiedenen Restriktionsenzymen erlaubte die
Generierung von ca. 800 bp langen cDNA-Fragmenten, die
zur Repräsentativen Differenzanalyse zum Einsatz kamen.
- 25 Gleiche Teile von „tester-cDNA“ wurden entweder mit den
Adaptoren A oder B ligiert und anschließend getrennt
mit einem Überschuß an „driver-cDNA“ bei 68°C
hybridisiert. Danach wurden die beiden Ansätze
vereinigt und einer zweiten Hybridisierung mit frischer
30 denaturierter „driver-cDNA“ unterworfen. Die
angereicherten „tester“-spezifischen cDNAs wurden

anschließend durch PCR mit für die Adaptoren A bzw. B spezifischen Primern des Kits mit 2 Minuten Elongationszeit bei 72°C exponentiell amplifiziert, 27 Zyklen (10'' 94°C, 30'' 66°C, 2' 72°C). Für eine
5 weitere Anreicherung wurde ein Aliquot dieser Reaktion einer zweiten PCR mit spezifischen nach innen versetzten („nested“) Primern des Kits mit 2 Minuten Elongationszeit bei 72°C unterworfen, 10 Zyklen (10'' 94°C, 30'' 66°C, 2' 72°C). Das aus dieser
10 Reaktion resultierende Produkt wurde in 3 verschiedene eigens modifizierte pCR3.1(+)-Vektoren (Invitrogen): Vektor (1.ORF), Vektor (2.ORF) und Vektor (3.ORF) (Fig. 5: CMV Cytomegalovirus; BGH Bovine Growth Hormone; ORF Open Reading Frame)
15 ligiert und anschließend in kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transformiert. Diese Vektoren ermöglichen die Expression in eukaryontischen Zellen in 3 unterschiedlichen Leserahmen.

Für die Konstruktion der 3 Vektoren wurde der
20 pCR3.1(+)-Vektor (Invitrogen) mit NheI und HindIII (Promega) geschnitten und mit jeweils einem dsDNA Oligomer, das durch das Annealen von jeweils zwei ssDNA Oligomeren (SEQ ID NO:3 und 4; Vektor ORF1) oder (SEQ ID NO:5 und 6; Vektor ORF2) oder (SEQ ID NO:7 und 8;
25 Vektor ORF3) hergestellt wurde, nach Standardprotokollen ligiert (z.B. Ausubel et al., 1994; Sambrook et al. 1989). Die 3 Vektortypen besitzen ein Startcodon und eine Klonierungsstelle für die Expression in einem jeweils von den anderen beiden
30 Vektoren unterschiedlichen Leserahmen.

Die in drei Ansätzen (Vektor 1. ORF, 2. ORF und 3. ORF) durchgeführte Transformation von kompetenten *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) mit der cDNA der subtraktiven cDNA-Bibliothek ergab etwa 9600 Klone. Diese wurden
5 mittels PCR Analyse auf die Präsenz und Länge der Insert cDNA überprüft. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: die 9600 Klone wurden in 96-Napf Blöcken in LB-Amp Medium für 48 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden 5 µl Aliquots der *E. coli*
10 Suspensionen in 500 µl TE Puffer für 10 Minuten auf 100°C erhitzt und 1,5 µl davon als Vorlage für eine PCR verwendet, bei der das Insert des Vektors mit flankierenden Primern (SEQ ID NO:9 und 10) amplifiziert wurde, 35 Zyklen (1' 94°C, 1' 55°C, 2' 72°C). Die
15 PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Die verbleibenden Bakterienkulturen wurden als Glycerinstammkulturen bei -80°C gelagert.

Dadurch wurde eine cDNA-Subtraktionsbibliothek aus
20 3450 Einzelklonen erhalten, die als *E. coli* Glycerin-Stammkulturen vorlagen und deren Insertlänge durch die Agarose-Gel-Elektrophorese bekannt war. Dabei konnte, wie erwartet, eine mittlere Länge der inserierten cDNA-Fragmente von ca. 800 bp nachgewiesen werden.

25

Beispiel 3:

DNA-Sequenzierung und Annotation von Klonen der subtraktiven cDNA-Bibliothek der Pankreastumorzelllinie MZ.PC2 m7#1 B7.1#3

143

141

Die Plasmid-DNA von 50 aus der subtraktiven cDNA-Bibliothek willkürlich ausgewählten Klonen wurde entsprechend den Herstellerangaben (QIAGEN) isoliert und nach der Sanger-Methode auf einem ABI-Prism Gerät
 5 sequenziert. Die so ermittelten Sequenzen wurden mittels BLAST-Search (National Center for Biotechnology Information) annotiert und EST-Datenbankvergleichen unterzogen. Das erlaubte die Identifizierung von 38 bekannten und 12 unbekannten Genen. Für letztere
 10 existierten lediglich EST-Einträge. Für die 12 unbekannten Gene wurde eine Abschätzung des Expressionsprofils vorgenommen: dabei wurde für alle in Datenbanken ESTs mit > 95% Identität (BLAST) zur experimentell ermittelten Sequenz das Ausgangsgewebe
 15 für die entsprechende cDNA-Bibliothek überprüft. Es wurde eine Unterteilung in i) kritische Normalgewebe, ii) foetale, „verzichtbare“ und immunprivilegierte Gewebe und iii) Tumore und Tumorzelllinien vorgenommen. Auf der Basis dieses „virtuellen mRNA-Profiles“ wurden 4
 20 Klone (R2, R8, R11 und R12) für eine weitere experimentelle Analyse ausgewählt.

Beispiel 4:

Transkriptionelle Analyse der Kandidaten-Klone in
 25 Tumor- und Normalgewebe

Zwischen 2 und 5 µg total-RNA aus Tumor- oder Normalgeweben wurden mittels SuperScriptII (GibcoBRL) oder AMV-RT (Promega) entsprechend den Herstellerempfehlungen revers transkribiert. Für jede
 30 individuelle RNA Probe wurde ein zweiter Ansatz ohne

reverse Transkriptase als Kontrolle für Kontamination durch chromosomale DNA durchgeführt. Qualität und Menge der cDNAs wurde durch PCR mit β -Actin spezifischen Primern (SEQ ID NO:13 und 14) und GAPDH spezifischen Primern (SEQ ID NO:15 und 16) nach 30 und 35 Zyklen (1' 95°C, 1' 55°C, 1' 72°C), überprüft. Die 4 Kandidatengene wurden analog mit jeweils spezifischen Primern analysiert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Dabei zeigte ein Kandidat, der mit „R11“ bezeichnet wurde, nach 35 Zyklen mit R11-spezifischen Primern (SEQ ID NO:11 und 12) ein relativ spezifisches Tumor/Testis-Transkriptionsprofil; die semiquantitative RT-PCR von RNA aus Mammakarzinom, Lungen-Adenokarzinom, Lungen-Plattenepithelkarzinom, Nierenkarzinom, Kolonkarzinom, Herz, Lunge, Leber, Niere, Kolon, Milz und Testis ist in Fig. 1 dargestellt. Eine weitere qualitative PCR von cDNA aus Patientengewebe von 3 humanen Pankreastumoren mit denselben R11-spezifischen Primern (SEQ ID NO:11 und 12) zeigte die Expression in humanen Pankreastumoren (Fig. 2). Weiters wurde eine zusätzliche qualitative PCR von cDNA aus verschiedenen Tumorzelllinien von humanen Lungen- (LC 6, 16), Gallenblase- (GB 1) und Pankreastumoren (PC 1, 2) sowie zwei Melanomen (Mel 2, 7) mit denselben R11-spezifischen Primern (SEQ ID NO:11 und 12) durchgeführt, die eine deutliche Expression in allen Tumorzelllinien (Fig. 4) zu erkennen gab. Bei dieser Analyse wurde nach dem Protokoll von Perkin Elmer (GeneAmp RNA PCR Kit, #N808-0017) vorgegangen (RT-Reaktion: (1x) 15'/42°C - 5'/99°C - 5'/4°C; PCR-Reaktion: (35x) 2'/95°C - 1'/95°C - 1'/60°C und (1x)

7'/72°C - 4°C (Fig. 4). Wie oben beschrieben, wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Als Größenmarker kam ein 1kb Größenmarker von Gibco BRL zum Einsatz.

5

Beispiel 5:

Transkriptionsprofil von R11 in Normalgeweben

Für die Northern Blot Analyse wurden „Human Multiple Tissue Northern Blots“ (Clontech, Palo Alto und
10 Invitrogen) mit dem [α -³²P]dCTP (NEN, Boston) markierten etwa 1000 bp langen R11 PCR Produkt bei 68° für 2 h hybridisiert. Die Visualisierung erfolgte durch Standard-Autoradiografie (Hyperfilm, Amersham). Fig. 3 zeigt das Ergebnis dieser Analyse: von 19 Normalgeweben
15 (Pankreas, Nebennierenmark, Schilddrüse, Nebennierenrinde, Testis, Thymus, Dünndarm, Magen, Hirn, Herz, Skelettmuskel, Kolon, Milz, Niere, Leber, Plazenta, Lunge, Leukozyten). Für R11 zeigt sich in Plazenta, Nebennierenmark, Nebennierenrinde und in
20 Testis ein prominentes Transkript von 7,5 kb Länge. Eine sehr schwache Bande von 7,5 kb kann auch im Hirn nachgewiesen werden. Da alle diese Normalgewebe einen immunprivilegierten Status aufweisen (Streilein, 1995), ist bei einer auf diesem Antigen beruhenden
25 Immuntherapie eine Attacke durch CTL auszuschließen.

Weitere Transkripte von 3,8 kb und 2,3 kb, welche möglicherweise Spleißvarianten des 7,5 kb Transkripts darstellen oder von einem homologen Gen abgeleitet

sind, wurden im Nebennierenmark und der Nebennierenrinde identifiziert (Fig. 3).

Beispiel 6:

5 Klonierung der cDNA von R11

Zur Klonierung der humanen R11-cDNA wurde wie folgt vorgegangen: eine BLAST-Analyse ergab, daß zu der in Beispiel 3 durch Sequenzierung erhaltenen R11 „Originalsequenz“ (796 bp) ein überlappendes Fragment
10 AF038197 und eine Vielzahl von überlappenden ESTs, wie z.B. N42343, W69539, H82474, H51766, N28313, identifiziert werden konnten. Ausgehend von der Sequenz AF038197 wurde mit dem EstExtractor auf TigemNet (<http://gcg.tigem.it/cgi-bin/uniestass.pl>) ein mit dem
15 Klon R11 überlappendes Contig gefunden. Die Überlappung des Contigs und der 796 bp R11 „Originalsequenz“ konnte durch PCR-Amplifikation mit einem R11 „Originalsequenz“ spezifischen Primer und einem am Contig liegenden Primer (SEQ ID NO:17 und 18) aus einer SuperScript™
20 Human Testis cDNA Library (GibcoBRL) und anschließender Sequenzierung verifiziert werden. Aus der SuperScript™ Human Testis cDNA Library konnten durch eine PCR mit einem R11 spezifischen Primer (SEQ ID NO: 19) und einem Vektor-spezifischen Primer (SEQ ID NO: 20) weitere zu
25 R11 gehörende Fragmente unter Verwendung des Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) und dem dort beschriebenen Standardprotokoll amplifiziert werden. Die Kenntnis dieser neuen Sequenzen ermöglichte wiederum PCR Ansätze mit R11 spezifischen Primern (SEQ ID NO: 21 und 22) und
30 dem Vektor-spezifischen Primer (SEQ ID NO: 20).

142 145

Für die weiter Verlängerung der R11-cDNA wurde ein humane Testis Rapid-Screening cDNA Library panel (OriGene Technologies, Inc) mit für R11 spezifischen Primern (SEQ ID NO: 23 und 24) unter den vom Hersteller
5 angegebenen Standard PCR-Bedingungen gescreent. Von den positiven Nöpfchen wurde ein Aliquot als Template für eine PCR mit einem R11 spezifischen und einem für den Vektor spezifischen Primer (SEQ ID NO: 25 und 26) unter Verwendung des Advantage cDNA PCR Kit (Clontech) und
10 dem dort beschriebenen Standardprotokoll amplifiziert.

Für die Sequenzanalyse wurden Aliquote der PCR-Ansätze direkt in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen) ligiert und anschließend in kompetente *E. coli* (OneShot™, Invitrogen) transformiert und, wie in Beispiel 3
15 beschrieben, sequenziert.

Der klonierte Bereich der R11-cDNA beträgt 5714 bp wobei das Vorhandensein eines PolyA-Schwanzes am 3'-Ende der Sequenz für die Vollständigkeit der cDNA in diesem Bereich spricht. Ein durchgehender Leserahmen
20 ist durch das Startkodon an Position 570 und das Stopkodon (TAA) an Position 1638 repräsentiert. Da zu diesem Gen keine Datenbankeintragungen von bekannten Genen existieren, kann über die Funktion keine Aussage getroffen werden. Eine Analyse des Proteinprofils
25 (<http://www.expasy.ch/prosite/>) ergab neben den zwei offensichtlichen Prolin-reichen Abschnitten (Position # 128-141 und 330-351 in SEQ ID NO: 2), potentielle Motive für zwei N-Glykosylierungsstellen (104-107 und 250-253), eine Protein Kinase C Phosphorylierungsstelle
30 (108-110), vier Casein Kinase II Phosphorylierungsstellen (99-102, 165-168, 198-201,

273-276), zwei N-Myristoylierungsstellen (21-26, 309-314) und eine Region mit Ähnlichkeit zum aktiven Zentrum von eukaryontischen und viralen Aspartat Proteinasen (16-27).

5

Beispiel 7:

Potentielle MHC-Bindungspeptide in der für den C-terminalen Teil von R11 kodierenden Region

Potentielle Peptid-Epitope innerhalb der kodierenden
10 Region des C-terminalen Fragmentes von R11 gemäß
(SEQ ID NO: 2) wurden mittels den von Parker et. al.,
1994 beschriebenen Algorithmen unter Zugrundelegung
bekannter Motive (Rammensee et al. 1995) durchgeführt.
Für die wichtigsten HLA-Typen, insbesondere für HLA-A1,
15 -A*0201, -A3, -B7, -B14 und -B*4403, wurden 9-mer
Kandidaten-Peptide identifiziert, von denen zu erwarten
ist, daß sie an die entsprechenden HLA-Moleküle binden
und daher immunogene CTL-Epitope darstellen; die
ermittelten Peptide sind in Tab. 1 aufgelistet. Durch
20 analoges Vorgehen können weitere potentielle Peptid-
Epitope für andere HLA-Typen bzw. 8- und 10-mer Peptide
ermittelt werden.

Tabelle 1

25 Immunogene Peptid-Kandidaten des C-terminalen
Fragmentes von R11 (356 Aminosäuren)

~~149~~

149

Start-position in SEQ ID NO: 2	Sequenz	HLA
1	MLQIHLPGR	HLA-A3
4	IHLPGRHTL	HLA-A*0201, HLA-B14
5	HLPGRHTLF	HLA-A3
31	YVAQNGIPL	HLA-B7
39	LRIKDWPIIL	HLA-B14
46	ILVEAIDGR	HLA-A3
53	GRPIASGPV	HLA-B14
64	ETHDLIVDL	HLA-B14
71	DLGDHREVL	HLA-A*0201, HLA-B7, HLA-B14
73	GDHREVLSE	HLA-B*4403
85	QSPFFPVVL	HLA-B7
92	VLGPRWLSA	HLA-A*0201
97	WLSAHPNI	HLA-A*0201
110	RSIVFDSEY	HLA-B*4403
112	IVFDSEYCR	HLA-A3
134	PPPAPQPPL	HLA-B7
141	PLYYPVDGY	HLA-A3

150

148

150	RVYQPVRYY	HLA-A3
152	YQPVRYYYV	HLA-A*0201
155	VRYYYYVQNV	HLA-B14
159	YVQNVYTPV	HLA-A*0201
169	EHVYPDHL	HLA-B14
177	LVDPHIEMI	HLA-A*0201, HLA-A1
183	EMIPGAHSI	HLA-A*0201
189	HSIPSGHVV	HLA-A1, HLA-B*4403
191	IPSGHVYSL	HLA-B7, HLA-A*0201
198	SLSEPEMAA	HLA-A*0201
199	LSEPEMAAL	HLA-A1
202	PEMAALRDF	HLA-B*4403
203	EMAALRDFV	HLA-A*0201
206	ALRDFVARN	HLA-A*0201
211	VARNVKDGL	HLA-B7
223	TIAPNGAQV	HLA-A*0201
224	IAPNGAQVL	HLA-B7
231	VLQVKRGWK	HLA-A3
232	LQVKRGWKL	HLA-A*0201, HLA-B14
257	YPRLSIPNL	HLA*7

157

149

266	EDQAHLATY	HLA-B*4403
270	HLATYTEFV	HLA-A*0201
306	GRDGQGRSL	HLA-B14
307	RDGQGRSLY	HLA-B*4403
308	DGQGRSLYV	HLA-B14
313	SLYVPVMIT	HLA-A*0201, HLA-A3
320	ITWNPHWYR	HLA-A3

152
150

Literatur

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D.,
5 Smith, J.A., Seidman, J.G., Struhl, K. (Eds), (1994),
Vol. 1+2 „Current Protocols in Molecular Biology“, John
Wiley&Sons. Inc.
- Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga,
10 J., and Knop, J. (1997), J. Immunol. Methods 203,
171-180.
- Blake, J., Johnston, J.V., Hellström, K.E., Marquardt,
H., and, Chen, L. (1996), J. Exp. Med. 184, 121-130.
15
- Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der
Bruggen, and A. Van Pel (1994), Annu.Rev.Immunol. 12:
337-365
- 20 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
25
- Brüggemann, M. und Neuberger, M.S., (1996), Immunol.
Today 17, 391-397
- Buschle M, Schmidt W, Zauner W, Mechtler K, Trska B,
30 Kirlappos H, Birnstiel M (1997), Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 94, 3256-3261

- 153
1510
- Celluzzi, CM and Falo, LD, Jr. (1998), J. Immunol. 160, 3081-3085
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 1914-1918.
- Coulie, P.G. (1997), Mol. Med. Today 3, 261-268
- 10 Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow, TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, and Slingluff, CL, Jr. (1994), Science 264, 716-719
- 15 Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6025-6030.
- 20 Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90, 3539-3543.
- 25 Elble, R., Widom, J., Gruber, A.D., Abdel-Ghany, M., Levine, R., Goodwin, A., Cheng, H.-C., and Pauli, B.U. (1997), J. Biol. Chem. 272, 27853-27861.
- Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, and Boger, J (1985),
30 J. Virol. 55, 836-839

~~154~~ 152

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

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

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

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, and Barnetson RS (1995), World J. Surg. 19, 352-358

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

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

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

~~155~~

153

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

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

- Jessup, JM and Loda, M (1998), Prognostic markers in
10 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.,
Appella, E., and Rosenberg, S.A. (1995), J. Immunol.
15 154, 3961-3968.

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

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

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

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

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

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

Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der
5 Bruggen P (1997) , J Exp Med 186:785-793

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

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

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

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

20

Mizushima, S. and Nagata, S. (1990), Nucleic Acids Res. 18, 5322.

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

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

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

30

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

~~157~~ 155

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

5

Paterson Y, Ikonomidis G (1996), Curr. Opin.
Immunol. 5, 664-669

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

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

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

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

20

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

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

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

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

30

Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B.,
Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G.,

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

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

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

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

15

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

Selvakumar, A., Mohanraj, B.K., Eddy, R.L., Shows,
T.B., White, P.C., and Dupont, B. (1992) Immunogenetics
20 36, 175-181.

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

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

Streilein, J.W. (1995), Science 270, 1158-1159.

159 157
 Tepper, R.I., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1989),
 Cell 57, 503-512.

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

- Toes, R.E., Hoeben, R.C., Van der Voort, E., Rensing,
 M.E., Van-der-Eb, A.J. Melief, C.J.M., and Offringa, R.
 10 (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 14660-14665

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

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

Van den Eynde, BJ, and 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, and
 T. Boon. (1991), Science 254, 1643-1647

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

- van Elsas, A., van der Minne, C.E., Borghi, M., van der
 Spek, C.W., Braakman, E., Osanto, S., and Schrier, P.I.
 30 (1996), CTL Recognition of an IL-2 Producing Melanoma
 Vaccine. In: Immunology of human melanoma. Tumor-host

interaction and immunotherapy, edited by M. Maio,
Amsterdam: IOS, 1996, p. 165-173

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

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

10

Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler,
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

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

20

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

Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C,
25 Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum
Büschchenfelde KH, Beach D (1995), Science 269:1281-1284

Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F.,
Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R.,
30 August, J.T., and Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 92, 11671-11675.

~~151~~

159

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

- 5 Zhu, D., Cheng., C.-F., and Pauli, B.U. (1992), J. Clin. Invest. 89, 1718-1724.

162

160

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Boehringer Ingelheim International GmbH
 <120> Tumorassoziertes Antigen
 <130> 12-111
 10 <140>
 <141>
 <160> 70
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 5714
 <212> DNA
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(569)
 25 <223> putativ
 <220>
 <221> CDS
 <222> (570)..(1640)
 30 <220>
 <221> 3'UTR
 <222> (1641)..(5714)
 35 <400> 1
 cttgagacct caagcgaagg ttgcaacgca agatcagagc tgcgcaaggc atgggggtctg 60
 tcatogacta ctcaatgctt tccagatgat tgccaggac ctggattgga acgagcctgc 120
 40 gctgattgac cagtaccacg agggcctcag cgaccacatt caggaggagc tctcccacgt 180
 cgaggtcgcc aagtcgctgt ctgctctgat tgggcagtgc attcacattg agagaaggct 240
 ggccagggct gctgcagctc gogagccacg ctogccaacc ogggcgctgg tgttgccctca 300
 45 cattgcaagc caccaccag tagatcaacc gagcoggtgg gaggtgccog catgcgcctg 360
 acgcaggaag aaaaagaaag acgcagaaag ctgaacctgt gcctctactg tggaacagga 420
 50 ggtcactacg ctgacaattg toctgccaag gcctcaaagt ctogcoggc gggaaactcc 480
 cgggccccgc tgtagaggga ccttcagcga cggggccaga aataataagg tccccacaag 540

263

161

	atgatgcttc atctocacac ttgcaagtg atg ctc cag att cat ctt cgg ggc	593
	Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly	
	1 5	
5	aga cac acc ctg ttc gtc cga gcc atg atc gat tct ggt gct tct ggc	641
	Arg His Thr Leu Phe Val Arg Ala Met Ile Asp Ser Gly Ala Ser Gly	
	10 15 20	
10	aac ttc att gat cac gaa tat gtt gct caa aat gga att cct cta aga	689
	Asn Phe Ile Asp His Glu Tyr Val Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu Arg	
	25 30 35 40	
15	atc aag gac tgg cca ata ctt gtg gaa gca att gat ggg cgc ccc ata	737
	Ile Lys Asp Trp Pro Ile Leu Val Glu Ala Ile Asp Gly Arg Pro Ile	
	45 50 55	
20	gca tgg ggc cca gtt gtc cac gaa act cac gac ctg ata gtt gac ctg	785
	Ala Ser Gly Pro Val Val His Glu Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu	
	60 65 70	
25	gga gat cac cga gag gtg ctg tca ttt gat gtg act cag tct cca ttc	833
	Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser Phe Asp Val Thr Gln Ser Pro Phe	
	75 80 85	
30	ttc cct gtc gtc cta ggg cgg cgc tgg ctg agc gca cat gat ccc aat	881
	Phe Pro Val Val Leu Gly Pro Arg Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn	
	90 95 100	
35	atc aca tgg agc act cga tct atc gtc ttt gat tct gaa tac tgc cgc	929
	Ile Thr Trp Ser Thr Arg Ser Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg	
	105 110 115 120	
40	cac cac tgc cgg atg tat tct cca ata cca cca tgg ctc cca cca cca	977
	His His Cys Arg Met Tyr Ser Pro Ile Pro Pro Ser Leu Pro Pro Pro	
	125 130 135	
45	gca cca caa cgg cca ctc tat tat cca gta gat gga tac aga gtt tac	1025
	Ala Pro Gln Pro Pro Leu Tyr Tyr Pro Val Asp Gly Tyr Arg Val Tyr	
	140 145 150	
50	caa cca gtg agg tat tac tat gtc cag aat gtg tac act cca gta gat	1073
	Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr Val Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val Asp	
	155 160 165	
55	gag cac gtc tac cca gat cac cgc ctg gtt gac cct cac ata gaa atg	1121
	Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met	
	170 175 180	
60	ata cct gga gca cac agt att ccc agt gga cat gtg tat tca ctg tcc	1169
	Ile Pro Gly Ala His Ser Ile Pro Ser Gly His Val Tyr Ser Leu Ser	
	185 190 195 200	

	gaa cct gaa atg gca gct ctt cga gat ttt gtg gca aga aat gta aaa	1217
	Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn Val Lys	
	205 210 215	
5	gat ggg cta att act cca aog att gca cct aat gga gcc caa gtt ctc	1265
	Asp Gly Leu Ile Thr Pro Thr Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu	
	220 225 230	
10	cag gtg aag agg ggg tgg aaa ctg caa gtt tct tat gat gcc gag tcc	1313
	Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu Gln Val Ser Tyr Asp Ala Glu Ser	
	235 240 245	
15	aac aat ttt act atc cag aat cag tat cct cgc cta tct att cca aat	1361
	Asn Asn Phe Thr Ile Gln Asn Gln Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn	
	250 255 260	
20	tta gaa gac caa gca cac ctg gca aog tac act gaa ttc gta cct caa	1409
	Leu Glu Asp Gln Ala His Leu Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val Pro Gln	
	265 270 275 280	
	ata cct gga tac caa aca tac ccc aca tat gcc gog tgc cog acc tac	1457
	Ile Pro Gly Tyr Gln Thr Tyr Pro Thr Tyr Ala Ala Cys Pro Thr Tyr	
	285 290 295	
25	cca gta gga ttc gcc tgg tac cca gtg gga cga gac gga caa gga aga	1505
	Pro Val Gly Phe Ala Trp Tyr Pro Val Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg	
	300 305 310	
30	tca cta tat gta cct gtg atg atc act tgg aat cca cac tgg tac cgc	1553
	Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg	
	315 320 325	
35	cag cct cgg gta cca cag tac cgg cgg cca cag cgg cgg cct cca cca	1601
	Gln Pro Pro Val Pro Gln Tyr Pro Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro	
	330 335 340	
40	cca cca cgg cgg cgg cct cca tct tac agt acc ctg taa atacctgtca	1650
	Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Tyr Ser Thr Leu	
	345 350 355	
45	gctatggaag gttaggcca ctctggactg gcacacatcc taaagcacca aaagaccttc	1830
	aacatitttct gagagcaaca gagtatttgc caataaatga tctctcattt ttccaccttg	1890
50	actgccaatc taactaaaat aattaataag tttactttoc agccagtccct ggaagtctgg	1950
	gttttaacctg ccaaaacctc catcaccatc taaattatag gctgccaat ttgctgttta	2010
	acatttacag agaagctgat acaaacgcag gaaatgctga tttctttatg gagggggaga	2070

cgaggaggag gaggacatga cttttcttgc ggtttcggta ccctcttttt aaatcactgg 2130
 5 aggactgagg ccttattaag gaagccaaaa ttatcgggtgc agtgtggaaa ggcttccgtg 2190
 atoctctcgc tgcacccctta gaaacttcac cgtcttcaaa ctccatttcc atggttctgt 2250
 taattctcaa ggagcagcaa ctogactggc tctcccagga gcaggaaaaa cccttgtgac 2310
 10 atgaaacatc tcaggcctga aaagaaagtg ctctctcaga tggactcttg catgttaaga 2370
 ctatgtcttc acatcatggt gcaaatacaca tgtaccaat gactccggct ttgacacwac 2430
 accttaccat catcatgcca tgatggcttc caciaagcat taaacctggc aaccagagat 2490
 15 tactggtggc tcagcgttg ttagatgttc atgaaatgtg accaactctc aatcaacctt 2550
 gagggctaaa gagtagcaca tcaaaaggac tcaaaaatcc cataccaac tcttaagaga 2610
 20 tttgtcctgg tacttcagaa agaattttca tgagtgttct taattggctg gaaaagcacc 2670
 agctgaogtt ttggaagaat ctatccatgt gtctgcctcc atatgcatct gggcatttca 2730
 tcttcagtc cctcattaga ctgtagcatt aggatgtgtg gagagaggag aaatgattta 2790
 25 gcaccagat tcacactcct atgcctggaa gggggacatc tttgaagaag aggaattagg 2850
 gctgtggaca ctgtcttgag gatgtggact tcttagtga gctccacatt acttgatggt 2910
 30 aaccacttca aaaggatcag aatccaogta atgaaaaagg tccctctaga ggtggagct 2970
 gatgtgaagc tgccaatgga tgaaaagcct cagaaagcaa ctcaaaggac tcaaagcaac 3030
 ggacaacaca agagtgtct tcagcccagt gacacctctg atgtccctg gaagctttgt 3090
 35 gctaacctgg gactgcctga ctctcttag cctggtccct tgctactacc ttgaactggt 3150
 ttatctaacc tctcttttct tgtttaattc tttgctactg ccattgacct tgctgcagga 3210
 40 tttgtgtcat tttcctgcct ggttgctgag actccatttt gctgcacac acagagatgt 3270
 aagaggcagg cttaattgc caaagcacag tttgagcagt agaaaacaac atggtgtata 3330
 tctcaaattg cctgacatga agaggagtct aacggtgaag tttcactttt catcagcatc 3390
 45 atctttcaca tgttcattat catcogctct tattcttgca tgtttaaaca cttaaaattt 3450
 ttagtataat ttttagtgtg ttttgaagtg gtgactaggc tttcaaaaac ttccattgaa 3510
 50 ttacaaagca ctatccagtt cttattgtta aactaagtaa aaatgataag taacatagtg 3570
 taaaatattc ctttactgtg aacttcttac aatgctgtga atgagaggct cctcagaact 3630

ggagcatttg tataataatt catcctgttc atcttcaatt ttaacatcat atataatttc 3690
 aattctatca attgggcctt taaaaatcat ataaaaggat ataaaatttg aaaagagaaa 3750
 5 cctaattggc tatttaatcc aaaacaactt ttttttctt tcaatggaat cagaaagctt 3810
 gtcaatcact catgtgtttt agagtaatta cttttaaaat ggtgcatttg tgcttctgaa 3870
 ctattttgaa gagtcacttc tgtttacctc aagtatcaat tcctcctcca tacatttgaa 3930
 10 ttcaagttgt tttttgtcaa atttacagtt gtcaattgat cttcaagctg caggggtgcct 3990
 agaaatgggc cgttgtctgt agccttgga tgtgcacacg gacatttgcc accactgcaa 4050
 15 gcaaaagtct ggagaagttc accaacgaca agaacgatta gggaaaatat gctgctgtgg 4110
 gttaacaact cagaaagtc ctgatccaca tttggctgtt tactaaagct tgtgattaac 4170
 tttttggcag tgtgtactat gctctattgc tatatatgct atctataaat gtagatgtta 4230
 20 aggataagta attctaaatt tattattcta tagttttgaa gtttggttaa gtttctttc 4290
 actcaattga tttattttgt tgttaatcaa atttatgtta attggatcct ttaaattttt 4350
 25 tttggcattt tccaacaaaa atggctttat tcataagaaa ggaaaaaat caatggaatt 4410
 tgatatctaa agaagttaga aaggagcaa aataaaaaac ataaaggaga tagatgaatt 4470
 agtaagcaaa tcagtagtog agtttttcaa actggcaaaa ttaattaatt gacttttagc 4530
 30 ccaaatttac attgttaatt aaatcaagaa ggaagaagat ctaagagctc ccattgatag 4590
 gcaagcctag agagaactag ctaaatttat catgctagga tattgaaaca cagaaagttt 4650
 35 acatacatth atgaagggc aatttagttt ggacagtga gtatttgtct tagtggaaaa 4710
 aaggagaatt agtctgatca aatcgtgaag taatacagtg aacttgcagg tgcacaaaat 4770
 aagagggcca catctatatg gtgcagtctg gaattctgtt taagtttgta ggtacctctt 4830
 40 ggacttctga attgatccag ttgtcatcca ccacagacat ctacatcag atacagacag 4890
 ttccaagatt gacaacagag aacaacctgc tggaaagacc tgggcagaaa tggagagccc 4950
 45 tgcgggaacc atgctacatt ttcactaaa gagagaatgc acatctgatg agactgaaag 5010
 ttctttgttg ttttagattg tagaatggtt ttgaattggt ctgtggaaaa ttgcattgct 5070
 tttatttctt tgtgtaatca agtttaagta ataggggata tataatcata agcatttttag 5130
 50 ggtgggaggg actattaagt aattttaagt ggggtggggtt atttagaatg ttagaataat 5190
 attatgtatt agatatcgt ataagtggac atgcgtactt acttgtaacc ctttacccta 5250

167

165

taattgctat ccttaaagat ttcaaataaa ctgggagga actgcagga gaccaactta 5310
 tttagagoga attggacatg gataaaaacc ccagtgggag aaagttcaaa ggtgattaga 5370
 5 ttaataatTTT aatagaggat gagtgaacctc tgataaatta ctgctagaat gaacttgtca 5430
 atgatggatg gtaaattttc atggaagtta taaaagtgat aaataaaaac ccttgctttt 5490
 10 acccctgtca gtagccctcc tctaccact gaacccatt gccctaacc ctcttctaa 5550
 ctttattgct gtattctctt cactctatat ttctctctat ttgctaatat tgcattgctg 5610
 ttacaataaa aattcaataa agatttagtg gttaagtga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5670
 15 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 5714

<210> 2
 20 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 2
 25 Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu Phe Val Arg Ala
 1 5 10 15

 Met Ile Asp Ser Gly Ala Ser Gly Asn Phe Ile Asp His Glu Tyr Val
 20 25 30
 30 Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu Arg Ile Lys Asp Trp Pro Ile Leu Val
 35 40 45

 Glu Ala Ile Asp Gly Arg Pro Ile Ala Ser Gly Pro Val Val His Glu
 35 50 55 60

 Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser
 65 70 75 80
 40 Phe Asp Val Thr Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu Gly Pro Arg
 85 90 95

 Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn Ile Thr Trp Ser Thr Arg Ser Ile
 100 105 110
 45 Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg His His Cys Arg Met Tyr Ser Pro
 115 120 125

 Ile Pro Pro Ser Leu Pro Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Leu Tyr Tyr
 50 130 135 140

 Pro Val Asp Gly Tyr Arg Val Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr Val
 145 150 155 160

Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val Asp Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg
 165 170 175
 5 Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met Ile Pro Gly Ala His Ser Ile Pro
 180 185 190
 Ser Gly His Val Tyr Ser Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg
 195 200 205
 10 Asp Phe Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu Ile Thr Pro Thr Ile
 210 215 220
 Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu
 15 225 230 235 240
 Gln Val Ser Tyr Asp Ala Glu Ser Asn Asn Phe Thr Ile Gln Asn Gln
 245 250 255
 20 Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu Glu Asp Gln Ala His Leu Ala
 260 265 270
 Thr Tyr Thr Glu Phe Val Pro Gln Ile Pro Gly Tyr Gln Thr Tyr Pro
 275 280 285
 25 Thr Tyr Ala Ala Cys Pro Thr Tyr Pro Val Gly Phe Ala Trp Tyr Pro
 290 295 300
 Val Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile
 30 305 310 315 320
 Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Val Pro Gln Tyr Pro
 325 330 335
 35 Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser
 340 345 350
 Tyr Ser Thr Leu
 355
 40
 <210> 3
 <211> 31
 45 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> primer bind
 50 <222> (1) .. (31)
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 3
 ctagcccacc atggcatctg cagccaogtg a 31

5
 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

10
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

15
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 4
 agcttcacgt ggctgcagat gccatggtgg 30

20
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

25
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

30
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 5
 ctagcccacc atggcatctg cagcaogtga 30

35
 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

40
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(29)

45
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

50
 <400> 6
 agcttcacgt ggtgcagatg ccatggtgg 29

~~170~~

168

5 <210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(29)

10 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 <400> 7
 15 ctagccacc atggcatctg cacacgtga 29

20 <210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(28)

25 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 <400> 8
 30 agcttcacgt gtgcagatgc catggtgg 28

35 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> primer_bind
 40 <222> (1)..(23)

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 45 <400> 9
 gggcggtagg cgtgtacggt ggg 23

50 <210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

121

169

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(26)

5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 10
 gcaactagaa ggcacagtcg aggctg 26

10

<210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 15 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(27)

20 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 11
 25 gtttggacag tgaggtattt gtcttag 27

<210> 12
 <211> 27
 30 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> primer_bind
 35 <222> (1)..(27)

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

<400> 12
 40 ctttcagca ggttggtctc tgttgtc 27

<210> 13
 45 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 50 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 <400> 13
 tgacggggtc acccacactg tgcccatcta 30
 5
 <210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 10 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(29)
 15
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 <400> 14
 20 ctagaagcat tgcgggtggac gatggaggg 29
 <210> 15
 <211> 22
 25 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> primer_bind
 30 <222> (1)..(22)
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 35 <400> 15
 aaggtgaagg tcggagtcaa cg 22
 <210> 16
 40 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 45 <221> primer_bind
 <222> (1)..(24)
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 50 <400> 16
 ggcagagatg atgacccttt tggc 24

173

171

5 <210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(26)
 10
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

 15 <400> 17
 tattttgctc cctttctaac ttcttt 26

 20 <210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> primer_bind
 25 <222> (1)..(30)

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

 30 <400> 18
 ttctactttt catcagcatc atctttcaca 30

 35 <210> 19
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 40 <221> primer_bind
 <222> (1)..(27)

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 45
 <400> 19
 cgtagactc ctcttcatgt caggcaa 27

 50 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

134 172

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(22)
 5
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 <400> 20
 10 ggtgacacta tagaaggtac gc 22
 <210> 21
 <211> 28
 15 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> primer_bind
 20 <222> (1)..(28)
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 25 <400> 21
 caggcctgag atgtttcatg tcacaagg 28
 <210> 22
 30 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 35 <221> primer_bind
 <222> (1)..(29)
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 40 <400> 22
 gcatttcctg cgtttgtatc agcttctct 29
 <210> 23
 45 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 50 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

 <400> 23
 5 accagcacca caacogccac tctattatcc 30

 <210> 24
 <211> 30
 10 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <221> primer_bind
 15 <222> (1)..(30)

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

 20 <400> 24
 catatagtga tcttccttgt cagtctogtc 30

 <210> 25
 25 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 30 <221> primer_bind
 <222> (1)..(26)

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer
 35
 <400> 25
 gogcccatca attgcttcca caagta 26

 40 <210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 45 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(21)

 <220>
 50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: synthetischer Primer

 <400> 26
 gcagagctog tttagtgaac c 21

	<210> 27
	<211> 9
5	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 27
10	Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly Arg 1 5
	<210> 28
15	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 28
20	Ile His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu 1 5
	<210> 29
25	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 29
30	His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu Phe 1 5
	<210> 30
35	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
	<400> 30
40	Tyr Val Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu 1 5
	<210> 31
45	<211> 9
	<212> PRT
50	<213> Homo sapiens
	<400> 31
	Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu

~~177~~ 175

	1	5
5	<210> 32 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens	
10	<400> 32 Ile Leu Val Glu Ala Ile Asp Gly Arg 1 5	
15	<210> 33 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens	
20	<400> 33 Gly Arg Pro Ile Ala Ser Gly Pro Val 1 5	
25	<210> 34 <211> 9 <212> PRT	
30	<213> Homo sapiens <400> 34 Glu Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu 1 5	
35	<210> 35 <211> 9 <212> PRT	
40	<213> Homo sapiens <400> 35 Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu 1 5	
45	<210> 36 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens	
50	<210> 36 <211> 9 <212> PRT <213> Homo sapiens	

128 176

<400> 36
Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser Phe
1 5

5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 37
Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu
1 5

15

<210> 38
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Val Leu Gly Pro Arg Trp Leu Ser Ala
25 1 5

<210> 39
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
35 Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn Ile
1 5

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

<400> 40
45 Arg Ser Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr
1 5

50

<210> 41
<211> 9
<212> PRT

1

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

 5 <400> 46
 Val Arg Tyr Tyr Tyr Val Gln Asn Val
 1 5

 10
 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15
 <400> 47
 Tyr Val Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val
 1 5

 20

 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens

 <400> 48
 Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg Leu
 1 5

 30

 <210> 49
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 49
 Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met Ile
 40 1 5

 <210> 50
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 50
 50 Glu Met Ile Pro Gly Ala His Ser Ile
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 51
 His Ser Ile Pro Ser Gly His Val Tyr
 1 5
 10

 <210> 52
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 52
 Ile Pro Ser Gly His Val Tyr Ser Leu
 20 1 5

 <210> 53
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 53
 30 Ser Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala
 1 5

 35 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 54
 Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu
 1 5

 45
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 55
 Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe
 1 5

5 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 56
 10 Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe Val
 1 5

 15 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 57
 Ala Leu Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn
 1 5

 25 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 58
 Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu
 1 5

 35 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

 <400> 59
 Thr Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val
 1 5

 45 <210> 60
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 60

Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu
 1 5

5
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 61
 Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys
 1 5

15
 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20
 <400> 62
 Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu
 1 5

25
 <210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30
 <400> 63
 Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu
 1 5

35
 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40
 <400> 64
 Glu Asp Gln Ala His Leu Ala Thr Tyr
 1 5

45
 <210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

134 132

<400> 65
His Leu Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val
1 5
5

<210> 66
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu
1 5
15

<210> 67
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
25 Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr
1 5

<210> 68
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
35 Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val
1 5

<210> 69
40 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69
45 Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile Thr
1 5

50

<210> 70
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens,

<400> 70

5 Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg
1 5

Patentansprüche

1. Tumorassoziiertes Antigen der Bezeichnung R11,
5 dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ ID NO: 2 definierte Aminosäuresequenz aufweist oder diese als Teilsequenz enthält.
2. Immunogenes Proteinfragment oder Peptid, dadurch
10 gekennzeichnet, daß es von dem in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigen abgeleitet ist.
3. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 2, das eine humorale Immunantwort auslöst.
4. Immunogenes (Poly)peptid nach Anspruch 2, das bzw.
15 dessen Abbauprodukte durch MHC-Moleküle präsentiert werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen.
5. Immunogenes Peptid nach Anspruch 4, ausgewählt aus der Gruppe von Peptiden gemäß SEQ ID NO:27 bis 70.
- 20 6. Immunogenes (Poly)peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Immuntherapie von Krebserkrankungen *in vivo* oder *ex vivo*, wobei das (Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen des Patienten induziert, die R11 exprimieren.
- 25 7. Pharmazeutische Zusammensetzung für die parenterale, topische, orale oder lokale Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie als

wirksame Komponente ein oder mehrere immunogene (Poly)peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält.

- 5 8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie verschiedene, von R11 abgeleitete immunogene Peptide enthält.
- 10 9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein oder mehrere von R11 abgeleitete Peptide in Mischung mit von anderen tumorassoziierten Antigenen abgeleiteten Peptiden enthält.
- 15 10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, daß die Peptide an mindestens zwei verschiedene HLA-Typen binden.
- 15 11. Isoliertes DNA-Molekül, kodierend für ein Protein mit den immunogenen Eigenschaften des in Anspruch 1 definierten tumorassoziierten Antigens oder für Fragmente davon.
- 20 12. DNA-Molekül nach Anspruch 11, kodierend für ein immunogenes Polypeptid der Bezeichnung R11, das die in SEQ ID NO: 2 enthaltene Aminosäuresequenz aufweist oder diese enthält, bzw. für davon abgeleitete Proteinfragmente oder Peptide.
- 25 13. DNA-Molekül nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polynukleotid mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ist oder diese Sequenz enthält oder daß es ein Polynukleotid ist oder dieses enthält, das mit einem Polynukleotid der in SEQ ID NO: 1

dargestellten Sequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

14. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
- 5 15. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 11 bis 14, für die Immuntherapie von Krebserkrankungen, wobei das von dem DNA-Molekül exprimierte R11 (Poly)peptid eine Immunantwort gegen Tumorzellen des Patienten induziert, die R11 exprimieren.
- 10 16. Verwendung von Zellen, die das in Anspruch 1 definierte Antigen exprimieren, für die Herstellung einer Krebsvakzine.
17. Antikörper gegen ein in einem der Ansprüche 1 bis 5 definiertes (Poly)peptid.
- 15 18. Antikörper nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
19. Antikörper nach Anspruch 17 oder 18 für die Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen, die mit der Expression von R11 assoziiert sind.

Zusammenfassung

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

Fig. 1A

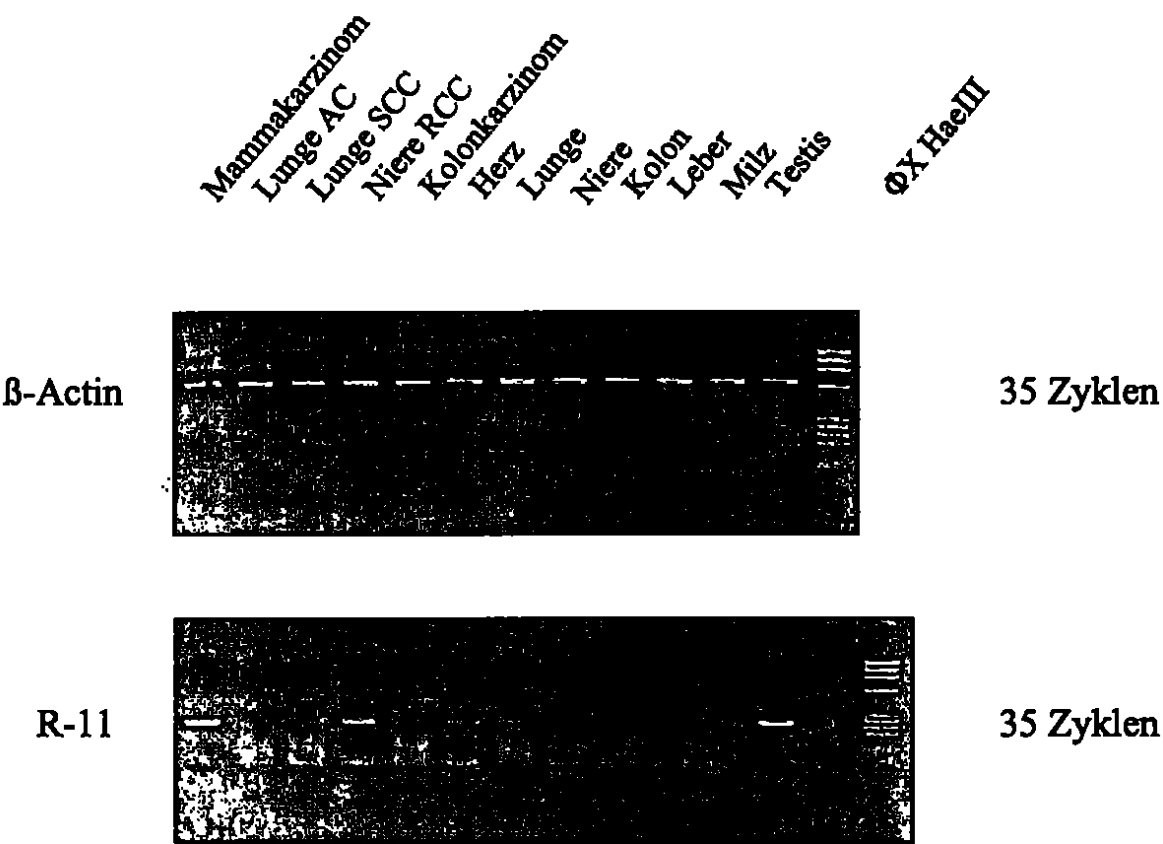
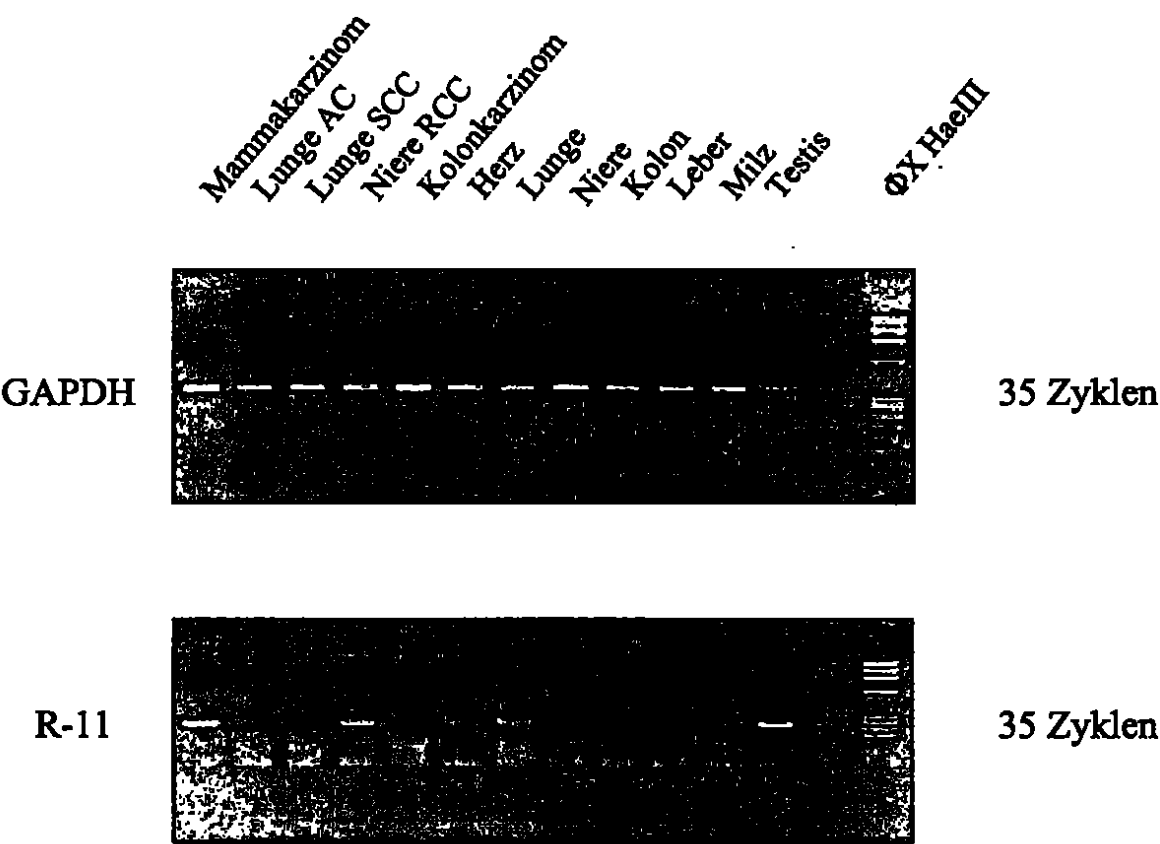
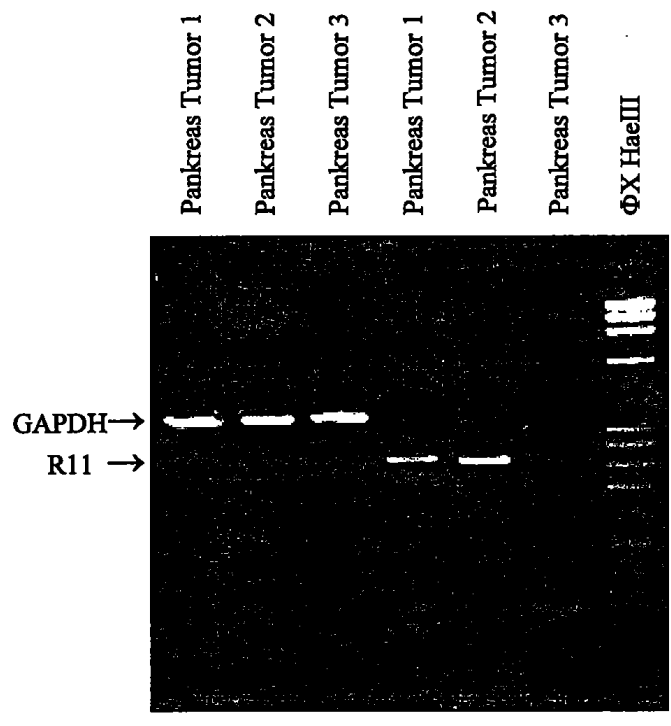


Fig. 1B



197
198

Fig. 2



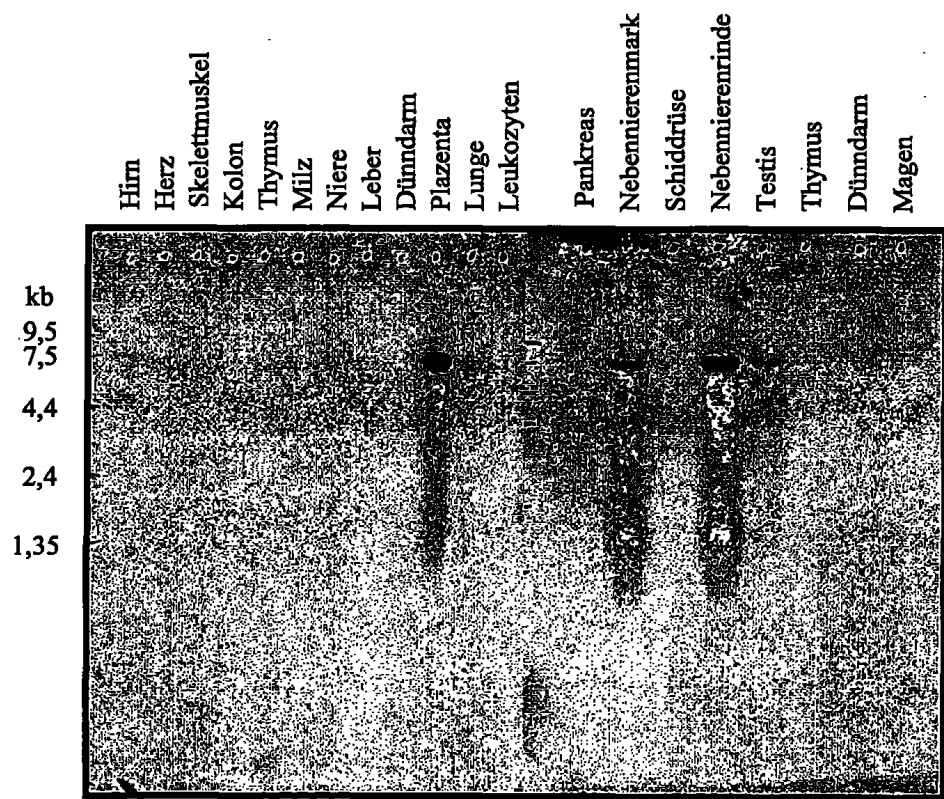
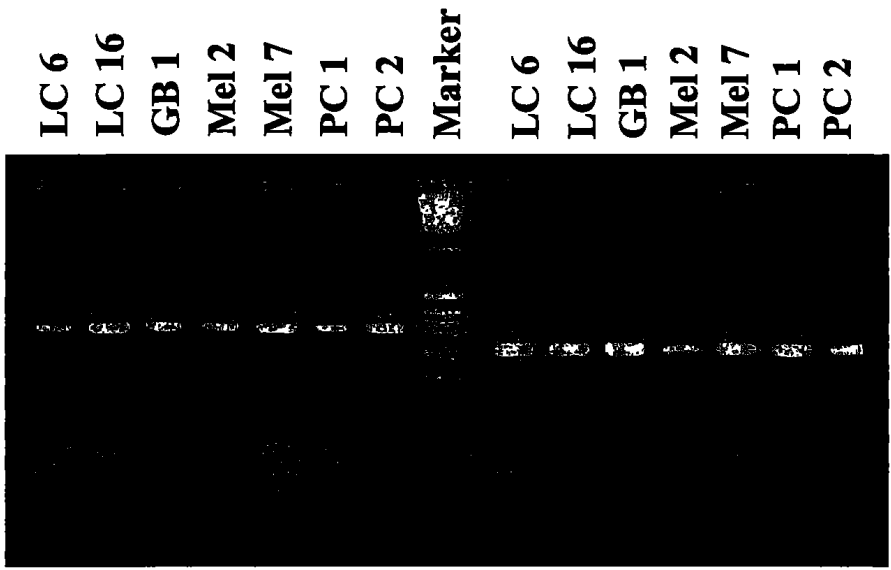


Fig. 3

193 191



(35 Zyklen)

Fig. 4

194 192

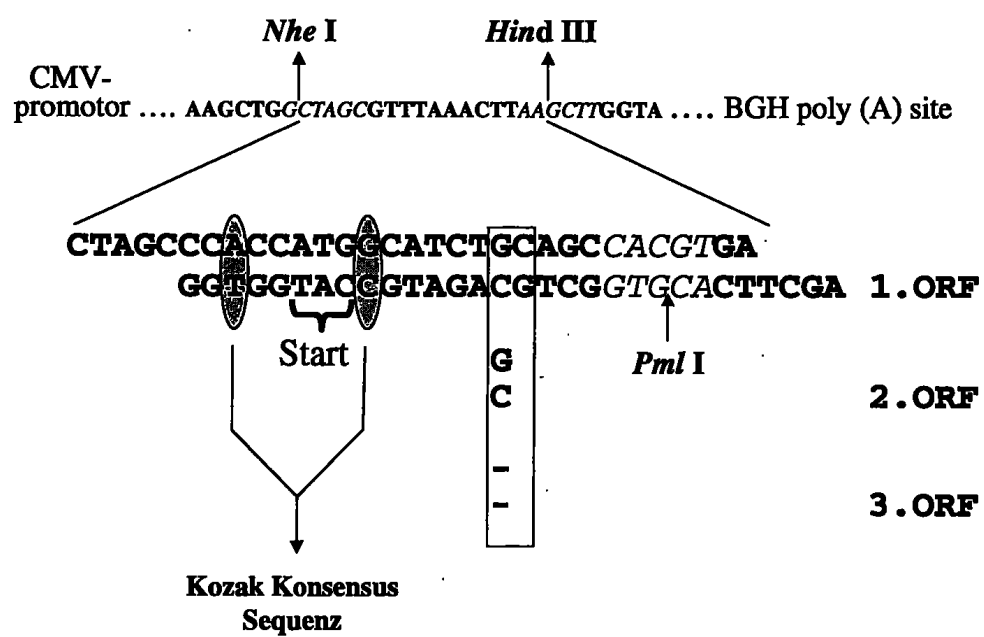


Fig. 5

195

196 194

REPÚBLICA FEDERAL ALEMANA



Certificación de prioridad sobre la presentación de una solicitud de Patente

Número de expediente: 199 36 563.6
Fecha de solicitud: 4 Agosto 1999
Solicitante/titular: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH, Ingelheim/Alemania
Titulo: Antígeno asociado con tumores
CIP: C 07 K, C 12 N, C07 H

Los documentos anejos con una reproducción fiel y exacta de los documentos
originales de esta solicitud.

Munich, 27 de Junio de 2000
Oficina de Patentes y Marcas Alemana
El Presidente
Por autorización:

Fdo.: Hoiß

198
195

- 1 -

Case 12-211 DI Fa/dc

5

10 BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

55216 Ingelheim am Rhein (D)

15 Título: Antígeno asociado con tumores

El invento se refiere a la inmunoterapia de enfermedades tumorales.

El sistema inmunitario tiene la misión de proteger al organismo con respecto de un gran número de diferentes microorganismos o de combatir activamente a éstos. La importancia de un sistema inmunitario intacto se demuestra 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 objetivo y satisfactoria en la lucha contra enfermedades infecciosas víricas o bacterianas. Además, se ha puesto de manifiesto 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 (TAA's de *Tumor Associated Antigens*) por componentes del sistema inmunitario. En el sentido más amplio, cualquier componente (peptídico o no peptídico) de una célula de tumor, que sea reconocido por un elemento del sistema inmunitario y conduzca a la estimulación de una respuesta inmunológica, puede actuar como antígeno inmunógeno de tumor. Les corresponde importancia especial en tal contexto a los antígenos de tumores, que no solamente provocan una reacción inmunológica sino que también producen 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 definida molecularmente contra tumores. Aun cuando todavía no se ha puesto en claro totalmente cuales de los elementos del sistema inmunitario son responsables de un rechazo del tumor, existe sin embargo un consenso acerca de que en este contexto los linfocitos T citotóxicos (CTL's de *Cytotoxic T-Lymphocytes*) que expresan CD8 desempeñan un papel principal (Coulie, 1997). Especialmente en el caso de los tipos de tumores (p.ej. los de melanoma y carcinoma renal), que presentan una tasa de remisión espontánea relativamente alta, se pudo comprobar una correlación entre la evolución clínica y la aparición acrecentada de células T CD8⁺ y CD4⁺ (Schendel y colaboradores, 1993; Mackensen y colaboradores, 1993; Halliday y colaboradores, 1995; Kawakami y colaboradores, 1995; Kawakami y colaboradores, 1996; Wang, 1997; Celluzzi y Falo, 1998). En este caso, se obtuvieron clones de CTL específicos o bien a partir de linfocitos que se habían infiltrado en tumores (TIL, de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) después de cultivación conjunta con células de tumores en su mayor parte autólogas y

estimulación *in vitro* por citoquinas. Tanto en modelos con animales como también en sistemas de cultivo celular humanos, cultivados *in vitro*, se pudo reforzar la respuesta de las células T frente a células de tumores por transfección de las células de tumores con citoquinas (van Elsas y colaboradores, 1997; Gansbacher y colaboradores, 1990; Tepper y colaboradores, 1989; Fearon y colaboradores, 1990; Dranoff y colaboradores, 1993).

Por causa de la correlación existente entre la remisión y la participación de células T CD8⁺, la identificación de antígenos asociados con tumores (TAA's), que son reconocidos por CTL's positivos para CD8 constituyen una meta principal declarada en el camino para el desarrollo de una vacuna contra tumores (Pardoll, 1998; Robbins y Kawakami, 1996). Todavía no se ha puesto en claro si también otros tipos de células del sistema inmunitario tales como p.ej. células T cooperantes CD4⁺, desempeñan un papel esencial; algunos estudios con péptidos MAGE-3/HLA-A1 en pacientes de melanoma apuntan en este sentido (Marchand y colaboradores, 1995; Boon y colaboradores, 1998). En los años pretéritos se han identificado una serie de TAA's, que son reconocidos por CTL's (Boon y colaboradores, 1994; van den Eynde y van der Bruggen, 1997).

Las células T reconocen a los antígenos como fragmentos de péptidos, que son presentados a superficies celulares de moléculas de MHC (de "*Major Histocompatibility Complex*", en un ser humano "HLA" de "*Human Leukocyte Antigen*" = antígeno de leucocitos humanos). Existen dos clases de moléculas de MHC: las moléculas de MHC-I aparecen en la mayor parte de las células con núcleo y presentan péptidos (usualmente 8-10-meros) que se forman por degradación proteolítica de proteínas endógenas (el denominado tratamiento de antígenos, "*antigen processing*"). Los complejos de péptidos y MHC-I son reconocidos por CTL's positivos para CD8. Las moléculas de MHC-II aparecen solamente en las denominadas "células presentadoras de antígenos (APC de *Antigen Presenting Cells*) profesionales" y presentan péptidos de proteínas exógenas, que se recogen y tratan en el curso de la endocitosis de las APC. Los complejos de péptidos y MHC-II son reconocidos por células T cooperantes CD4⁺. Mediante una interacción entre un receptor de células T y el complejo de péptido y MHC se pueden desencadenar diferentes mecanismos efectoros, que en el caso de los CTL's 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 órgano trasplantado), o el péptido (p.ej. en

el caso de patógenos intracelulares). Sin embargo, no todos los péptidos presentados cumplen los requisitos estructurales y funcionales para una interacción eficaz con células T (tal como ha sido descrito por Rammensee y colaboradores, 1995 y más adelante en esta memoria descriptiva).

- 5 Para el empleo de los TAA's 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 un ADNc (ADN cromosomal) que codifica el antígeno en vectores plasmídicos (vacunas de ADN; Tighe y colaboradores, 1998) o vectores víricos (Restifo, 1997).
- 10 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 adyuvativo (Paterson, 1996; Pardoll, 1998). En todos estos casos se necesitan un tratamiento y una presentación del antígeno por las denominadas "células presentadoras de antígenos (APC) profesiona-
- 15 les". Una posibilidad adicional es el empleo de péptidos sintéticos (Melief y colaboradores, 1996) que cuadran con los correspondientes epítomos de células T del antígeno y que o bien son cargadas desde fuera sobre las APC (Buschle y colaboradores, 1997; Schmidt y colaboradores, 1997) o son recogidas por las APC y transferidas intracelularmente a las moléculas de MHC I. La forma de aplicación más
- 20 eficiente terapéuticamente para un antígeno definido es determinada por lo general en estudios clínicos.

- Entre los antígenos reconocidos por los CTL's específicos para tumores o sus epítomos se cuentan moléculas, que pueden proceder de todas las clases de proteínas (p.ej. factores de transcripción, receptores, enzimas; para su recopilación véanse las
- 25 citas de Rammensee y colaboradores, 1995; Robbins y Kawakami, 1996). Estas proteínas no tienen necesariamente que estar situadas junto a la superficie celular, tal como es necesario esto en el caso del reconocimiento por anticuerpos. Con el fin de actuar como antígeno específico para tumores para el reconocimiento por los CTL's o a fin de ser empleadas para la terapia, las proteínas deben cumplir
- 30 determinadas condiciones: en primer lugar, el antígeno debe de ser expresado principalmente por células de tumores y no presentarse en los denominados tejidos normales "críticos" o presentarse solamente en menor concentración que en los tumores. Los tejidos normales críticos son tejidos esenciales; una reacción inmunitaria dirigida contra ellos podría tener en ciertas circunstancias unas

consecuencias muy graves, en parte letales. En segundo lugar, el antígeno debe de estar presente no solamente en el tumor primario sino también en las metástasis. Por lo demás, en lo que se refiere a una amplia aplicación clínica del antígeno es deseable que éste se encuentre presente en alta concentración en varios tipos de tumores.

- 5 Otra condición previa adicional para la idoneidad de un TAA como constituyente activo de una vacuna es la presencia de epítomos para células T en la secuencia de aminoácidos del antígeno; los péptidos derivados del TAA deben conducir a una respuesta *in vitro/in vivo* de las células T (péptido "inmunógeno"). Un criterio de selección adicional para un péptido inmunógeno ampliamente utilizable en el sector
- 10 clínico, es la frecuencia con la que un antígeno se pueda encontrar en una población dada de pacientes.

Los antígenos asociados con tumores (TAA's) 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, las de proteínas víricas, proteínas mutadas,

15 proteínas sobreexpresadas, proteínas de fusión 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 los TAA's, que constituyen el punto de partida para el desarrollo de una vacuna contra tumores, se

20 basan por una parte en el empleo de CTL's ya inducidos en pacientes (respuesta inmunitaria celular) o en el de anticuerpos (respuesta inmunitaria humoral), o se basan en la generación de perfiles de transcripción diferenciales entre tumores y tejidos normales. En el primero de los casos, el enfoque inmunológico, se emplean CTL's de pacientes para un escrutinio de bibliotecas eucarióticas de expresión del

25 ADNc de tumores, que presentan a los epítomos para CTL a través de moléculas de MHC-I (Boon y colaboradores, 1994), mientras que por medio de antisueros de pacientes muy afines se investigan bibliotecas procarióticas de expresión de ADNc en cuanto a la presencia de TAA's directamente a través de un análisis por inmunotransferencia de las calvas individuales (Sahin y colaboradores, 1995). Una

30 combinación de reactividad con los CTL's y de procedimientos químicos con proteínas constituye el aislamiento de péptidos, aislados a partir de MHC-I, de células de tumores, que se habían seleccionado previamente a través de su reactividad con los CTL's de pacientes. Los péptidos se separan por lavado a partir del complejo con MHC-I y se identifican con ayuda de la espectrometría de masas (Falk y colaborado-

res, 1991; Woelfel y colaboradores, 1994; Cox y colaboradores, 1994). Los enfoques, que utilizan los CTL's para la caracterización de antígenos, están vinculados con un considerable gasto, o no siempre tienen éxito, a causa de la cultivación y la activación necesarias de los CTL's.

- 5 Los métodos para la identificación de TAA's, que se basan en la comparación del perfil de transcripción de un tejido normal con el de un tejido de tumor, son múltiples y variados; entre ellos se encuentran la hibridación diferencial, el establecimiento de bancos de ADNc por sustracción (RDA, de "*representational difference analysis*" = análisis por diferencia representativa; Hubank y Schatz, 1994;
- 10 Diatchenko y colaboradores, 1996) y el empleo de la tecnología de *chips* (fragmentos) de ADN o del método de SAGE (Velculescu y colaboradores, 1995). Al contrario que el método inmunológico antes mencionado que se ayuda de CTL's de pacientes, en el caso del empleo de métodos de biología molecular se debe mostrar que los candidatos antígenos potenciales encontrados con ellos son específicos para tumores
- 15 (están asociados con tumores) y que realmente poseen epítomos para células T, que pueden provocar una respuesta citotóxica de las células T. En por lo menos uno de los casos (NY-ESO/LAGE-1) un antígeno era identificado tanto mediante la utilización de sueros de pacientes como también mediante RDA (Chen y colaboradores, 1997; Lethe y colaboradores, 1998), además se describieron epítomos para CTL's de este
- 20 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).

- El problema planteado por esta misión se resolvió produciendo en primer lugar
- 25 mediante RDA ("*representational difference analysis*") entre una línea celular derivada de un paciente con carcinoma de páncreas y un conjunto (*pool*) de 11 tejidos normales diferentes de una biblioteca por sustracción de ADNc. Para la generación de los fragmentos de ADNc de "*tester*" (ensayadores) y "*driver*" (impulsores) necesarios para la hibridación substractiva, se empleó, a diferencia del protocolo
- 30 original (Diatchenko y colaboradores, 1996), una mezcla de 6 diferentes enzimas de restricción. La utilización de una mezcla de diferentes enzimas de restricción, que necesitan 6 pares de bases como secuencia de reconocimiento, tiene en comparación con el protocolo original (Diatchenko y colaboradores, 1996) las siguientes ventajas:
- a) por elección en cada caso de dos enzimas de restricción, cuyas secuencias de

reconocimiento están representadas por una combinación de 6 elementos de las bases A/T (p.ej. Ssp I: AATATT) o C/G (p.ej. Nae I: GCCGGC) o A/C/G/T (p.ej. EcoR V: GATATC), se cortan de igual manera tanto regiones ricas en GC como también regiones ricas en AT de un gen, con lo cual se hace posible una representación homóloga de toda la región del gen en forma de fragmentos de restricción; b) además, es posible con ello obtener en la media estadística mayores fragmentos de ADNc del gen candidato (aproximadamente de 800 pb [pares de bases]), lo cual a su vez constituye una gran ventaja durante el subsiguiente análisis (por secuenciación y anotación) y la clonación del ADNc de tamaño completo ("*full-size*"). En el protocolo original (de Diatchenko y colaboradores, 1996) se empleó una enzima de restricción (Rsa I) que solamente reconoce a 4 bases, lo que conduce a una longitud media de 256 pb de los fragmentos y no puede tratar específicamente regiones ricas en CG o en AT. Con el fin de ajustarse a la cinética de hibridación modificada por los más largos fragmentos de ADNc de inserto, se modificó el protocolo de PCR (reacción en cadena de polimerasa), tal como se describe en el Ejemplo 2.

Para la selección de los antígenos sobreexpresados en el tumor, se aislaron en primer lugar los clones de ADNc obtenidos y de ellos se estableció en el formato de placas de 96 pocillos en cada caso un cultivo de reserva en glicerol, una preparación de plásmido y una colección de los fragmentos de PCR que constituyen el inserto. En primer lugar, se secuenciaron 50 fragmentos de ADNc seleccionados aleatoriamente de los 3.450 clones de la biblioteca substractiva de ADNc del carcinoma de páncreas, para la selección de los antígenos sobreexpresados en el tumor y se compararon con secuencias disponibles en bancos de datos. Entre los genes anotados en tal caso se encontraban 12 desconocidos, para los que existían en el banco de datos entradas de registro con EST's (de "*expressed sequence tags*" = marcas de secuencias expresadas). Un clon, el R11, tenía un perfil de EST apropiado en lo que se refiere a un empleo posible como TAA por medio de su presencia preferente en tejidos fetales. Otras investigaciones adicionales mediante una RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa) semicuantitativa y un análisis por transferencia Northern confirmaron la expresión preferente en diferentes tejidos de tumores (carcinoma de mama, de células renales y de páncreas) así como tejidos privilegiados inmunitariamente (de testículos, placenta y cápsulas suprarrenales) y ninguna expresión o sólo una escasa expresión en tejidos normales. Además, a partir de los datos obtenidos mediante experimentos por transferencia

Northern se puede sacar la conclusión de que el transcrito de R11 tiene una longitud de aproximadamente 7.5 kb y posiblemente existen en las cápsulas suprarrenales variantes por empalme o genes homólogos.

El ADNc de R11 humano fue clonado a partir de un testículo, la secuencia
5 obtenida se representa en SEQ ID NO: 1. La secuencia de R11 no muestra ni en el plano de los nucleótidos ni tampoco en el de las proteínas ninguna identidad u homología con un gen conocido. El ADNc de R11 obtenido dentro del marco del presente invento tiene un cuadro de lectura abierto (ORF, de *Open Reading Frame*) continuo que codifica 356 aminoácidos del que ha de suponerse en base a los
10 resultados obtenidos que representa el segmento terminal de C del antígeno de R11 completo. El ADNc de R11 clonado en el transcurso del presente invento presenta una longitud de 5.714 pb, realizándose que la presencia de una cola de poliA en el extremo 3' de la secuencia responde de la compleción del ADNc en esta región.

En base a los datos obtenidos dentro del marco del presente invento no se
15 puede excluir que en 5' del ADNc secuenciado se presente otro ATG, que constituya el ATG de iniciación; en este caso, el ADNc existente codifica el segmento terminal de C de R11. Informaciones acerca del extremo 5' y de una secuencia codificadora que está situada eventualmente más arriba de la secuencia, se pueden obtener por métodos clásicos de biología molecular, p.ej. mediante una 5'-RACE ("*rapid*
20 *amplification of cDNA ends*" = amplificación rápida de extremos de ADNc). En este método, se transcribe en sentido inverso un ARN, preferiblemente un ARNm (ARN mensajero), procedente de células o tejidos, en que se transcribe el R11 (p.ej. tejido de carcinoma de mama, células renales o páncreas) y a continuación se liga con un adaptador que tiene una secuencia conocida. Una PCR con un cebador de adaptador
25 (que se fija específicamente al adaptador en el extremo 5' del ADNc) y con un cebador específico para R11 (p.ej. SEQ ID NO: 25) permite la amplificación de correspondientes fragmentos de R11. Estos productos de PCR, como se describe en el Ejemplo 6, pueden ser clonados de acuerdo con métodos clásicos y ser caracterizados, especialmente por secuenciación del ADN.

30 Un método alternativo para la caracterización del extremo 5' es el escrutinio de bibliotecas de ADNc por hibridación con sondas de ADN específicas para R11 o el análisis con antisueros de bibliotecas de expresión de ADNc.

Si el escrutinio de bibliotecas de ADNc no conduce a la finalidad deseada, por causa de limitaciones debidas a la metodología, p.ej. una transcripción inversa

ineficiente, debida a estructuras secundarias pronunciadas del ARN, se pueden investigar bibliotecas genómicas, por el recurso de que p.ej., como en el escrutinio de bibliotecas de ADNc, por hibridación con sondas de ADN específicas para R11, se pueden aislar clones que contienen la información sobre secuencia situada hacia
5 arriba desde el extremo 5' del ADNc obtenido, p.ej. la región de promotor de R11.

En el transcurso de la clonación completa del ADNc de R11 se puede comprobar si el cuadro de lectura abierto obtenido en la región del presente segmento de ADNc, tiene una prolongación en la región de 5' y/o si se presentan cuadros de lectura alternativos.

10 El ADNc aislado dentro del marco del presente invento tiene la secuencia de nucleótidos que se indica en SEQ ID NO: 1; ha de suponerse (compárese arriba) que éste codifica el segmento terminal de C del antígeno asociado con tumores (TAA) con la denominación R11.

Una proteína, expresadas por el ADNc aislado tiene la secuencia de
15 aminoácidos que se representa en la SEQ ID NO: 2.

El invento concierne por consiguiente, en un primer aspecto, a un antígeno asociado con tumores con la denominación R11, que tiene la secuencia de aminoácidos que se indica en la SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto adicional, el presente invento concierne a un antígeno
20 asociado con tumores que lleva la denominación R11, que contiene como secuencia parcial la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2 (esto corresponde al caso de que en la dirección 5' existe una prolongación del presente cuadro de lectura abierto).

En el caso de la proteína con la secuencia indicada en SEQ ID NO: 2 se trata
25 de un productos, que es traducido por un transcrito con un tamaño de aproximadamente 7,5 kb, o que es traducidos por los transcritos con un tamaño de aproximadamente 3,8 kb y 2,3 kb, que se derivan de variantes por empalme del transcrito con 7,5 kb, como se pueden encontrar en el tejido de las cápsulas suprarrenales o se derivan de transcritos de los genes homólogos con ellos.

30 La secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 puede presentar desviaciones, p.ej. las que son debidas a un intercambio de aminoácidos, siempre y cuando que el derivado de R11 tenga las propiedades inmunógenas deseadas para la utilización en una vacuna contra tumores.

La secuencia natural de aminoácidos de R11 puede eventualmente ser

modificada, intercambiando aminoácidos individuales en un epítipo para CTL's de R11, a fin de producir, en comparación con el epítipo natural para CTL's de R11, un aumento de la afinidad de los péptidos de R11 con moléculas de MHC-I y con ello una inmunogenicidad aumentada y a fin de cuentas una reactividad acrecentada frente a tumores. Se pueden llevar a cabo modificaciones en la región de los epítipos para R11 en la proteína total de R11 (ésta es tratada por las APC's para dar los correspondientes péptidos) o en mayores fragmentos de proteínas de R11 o en péptidos de R11 (compárese más adelante).

En otro aspecto adicional, el presente invento concierne a fragmentos de polipéptidos y péptidos inmunógenos, que se derivan de R11. Estos últimos son denominados en lo sucesivo como "péptidos de R11". Un primer grupo lo constituyen los péptidos de R11, que provocan una respuesta inmunitaria humoral (inducción de anticuerpos). Tales péptidos son segmentos seleccionados de R11 (por lo menos con 12 a 15 aminoácidos), que se pueden determinar mediante los denominados algoritmos de predicción ("*prediction algorithms*") tales como p.ej. la "mancha de transferencia por probabilidad superficial" (Emini y colaboradores, 1985), la "mancha de transferencia por hidrofobia" (Kyte y Doolittle, 1982) y el "índice antigénico" (Jameson y Wolf, 1988).

Se incluyen conjuntamente también todos los péptidos que se derivan de la región del extremo terminal de N de R11, obtenida eventualmente en el transcurso de la clonación ulterior.

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 R11 específicas para tumores, convenientemente con ayuda de sondas procedentes del ADNc conforme al invento, aislado a partir de testículos, se clona el ADNc de R11 procedente de uno o varios tumores diferentes y las secuencias obtenidas se comparan con el ADNc de R11 de un tejido normal. Es de esperar que los péptidos de R11 de tumor, procedentes de un segmento de secuencia mutado con relación al R11 de tejido normal, presenten una inmunogenicidad acrecentada en comparación con péptidos de R11 de tejido normal procedentes del correspondiente segmento. El presente invento concierne por consiguiente, en un aspecto adicional, a péptidos de R11 que

se derivan de regiones de un R11 expresado en tumores, que tienen mutaciones específicas para tumores.

En la aplicación terapéutica, los péptidos de R11 se administran directamente o en una forma modificada (p.ej. acoplados con KLH = "*keyhole limpet hemocyanine*" (hemocianina de lapa de bocallave) y se determina la formación de anticuerpos
5 mediante análisis inmunológicos corrientes, p.ej. mediante un ELISA.

Otros péptidos de R11, preferidos dentro del marco del presente invento, son los que son presentados por moléculas de MHC y producen una respuesta inmunitaria celular. Existen dos clases de moléculas de MHC, a saber moléculas de MHC-I, que
10 son reconocidas por CTL's positivos para CD8, y moléculas de MHC-II, que son reconocidas por células T cooperantes, positivas para CD4.

Para que un péptido provoque una respuesta inmunitaria celular, éste se debe de fijar a una molécula de MHC, debiendo tener el paciente a tratar la molécula de MHC en su repertorio. La determinación del subtipo de MHC del paciente constituye
15 por consiguiente, en lo que se refiere a la provocación de una respuesta inmunitaria celular, una de las premisas esenciales para la utilización eficaz de un péptido en este paciente.

La secuencia de un péptido de R11 que se ha de emplear terapéuticamente, es preestablecida por la respectiva molécula de MHC en lo referente a los aminoácidos de anclaje y a la longitud. Posiciones de anclaje y longitudes definidas garantizan
20 que un péptido se adapte dentro del surco de fijación a péptidos de la respectiva molécula de MHC del paciente. Esto tiene como consecuencia que el sistema inmunitario sea estimulado y se genere una reacción inmunitaria celular, que se oriente hacia las células de tumores del paciente, en el caso de la utilización de un
25 péptido derivado de un antígeno de tumor.

Los péptidos de R11 inmunógenos pueden ser identificados de acuerdo con métodos conocidos, uno de los fundamentos para ello es la relación existente entre la fijación a MHC y la inducción de CTL's.

Puesto que, por lo tanto, la secuencia de péptidos inmunógenos es predeterminable de antemano por causa de su motivo de fijación a péptidos, los péptidos de
30 R11, que constituyen epítopos para CTL's, son identificados y sintetizados basándose en la secuencia de proteínas de R11. Para ello son apropiados diferentes métodos, que se habían utilizado para la identificación de epítopos para CTL's de conocidos antígenos de proteínas; p.ej. el método descrito por Stauss y colaborado-

res, 1992, para la identificación de péptidos de células T en un virus de papiloma humano.

Los requisitos específicos para un alelo de cada producto de alelo de MHC-I, establecidos a un péptido que se fija a la molécula de MHC y es presentado por ésta, fueron recopilados como un motivo (p.ej. Falk y colaboradores, 1991). Hasta ahora se conoce un gran número tanto de motivos de péptidos y MHC como también de ligandos y MHC. Un método, apropiado dentro del marco del presente invento para la búsqueda de epítopos de una proteína conocida, que se adapta dentro de una determinada molécula de MHC-I, fue descrito un artículo recopilativo de Rammensee y colaboradores, 1995. Éste comprende las siguientes etapas: en primer lugar se investiga la secuencia de proteínas en segmentos que corresponden al motivo de anclaje, siendo posibles determinadas variaciones en lo que se refiere a la longitud de los péptidos 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 correspondiente extremo terminal de C, y asimismo péptidos con otros residuos alifáticos, tales como Val o Met en el extremo terminal de C. De esta manera se obtiene una serie de candidatos de péptidos. Éstos son investigados en cuanto a la presencia del mayor número posible de residuos de anclaje, que ellos tienen en común con ligandos ya conocidos, y/o para determinar si éstos tienen residuos "preferidos" para diferentes moléculas de 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 son conocidos los requisitos en cuanto a la fijación de péptidos para determinadas moléculas de MHC, los candidatos a péptidos se pueden investigar también en cuanto a residuos que no sean de anclaje, que repercuten negativa o positivamente sobre la fijación, o que hacen posible a ésta por primera vez (Ruppert y colaboradores, 1993). En este modo de proceder hay que tomar en consideración sin embargo que el motivo de fijación de péptidos no es decisivo a solas para la búsqueda de ligandos naturales; también otros aspectos, p.ej. la especificidad para enzimas durante el tratamiento de antígenos, contribuyen a la identidad del ligando - adicionalmente a la especificidad de la fijación a 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 R11 inmunógenos, fue aplicado entre otros autores por Kawakami y colaboradores, 1995, con el fin de identificar epítopos

para gp100 sobre la base de motivos de HLA-A*0201 conocidos.

Los péptidos se pueden seleccionar también en lo referente a su capacidad para fijarse a moléculas de MHC-II. El motivo de fijación a MHC-II, que se extiende a lo largo de nueve aminoácidos, presenta un mayor grado de degeneración en las
5 posiciones de anclaje que el motivo de fijación a MHC-I. Hace poco tiempo, partiendo del análisis estructural por rayos X de moléculas de MHC-II, se desarrollaron métodos que permiten el análisis exacto de los motivos de fijación a MHC-II, y partiendo de ellos, de variaciones en la secuencia de péptidos (Rammensee y colaboradores, 1995 y la bibliografía original citada en ese lugar). Los péptidos, que se fijan a moléculas
10 de 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 en consecuencia directamente los CTL's p.ej. mediante segregación de citoquinas y aumento de la eficiencia de la presentación de antígenos por APC's (células dendríticas, macrófagos y células B).

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

Dentro del marco del presente invento, mediando utilización del algoritmo descrito por Parker y colaboradores, 1994, y por Rammensee y colaboradores, 1995,
20 para los más importantes tipos de HLA's, especialmente para los HLA-A1, -*0201, -A3, -B7, -B14 y -B*4403, se identificaron péptidos candidatos del fragmento terminal de C de R11, de los cuales es de esperar que se fijen a las correspondientes moléculas de HLA's y por lo tanto constituyan epítomos para CTL's inmunógenos; los péptidos determinados se enumeran en la Tabla 1. De una manera similar,
25 eventualmente mediando utilización de otros algoritmos, que toman en cuenta las diferentes características de los péptidos (hidrofobia, carga, tamaño) o los requisitos en cuanto a los péptidos, p.ej. la estructura tridimensional de la molécula de HLA, se pueden determinar otros potenciales epítomos para péptidos; esto es válido también para epítomos para péptidos de otros tipos de HLA's.

30 Después de haber seleccionado candidatos de péptidos de R11 con ayuda de los métodos indicados, se ensaya su fijación a MHC mediante análisis de fijación de péptidos. Como siguiente operación se determina la inmunogenicidad de los péptidos con buenas propiedades de fijación (la estabilidad de la interacción entre MHC y péptidos 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 seleccionado se pueden utilizar métodos, tal como han sido descritos por Sette y colaboradores, 1994, en combinación con análisis cuantitativos de la fijación a MHC. Alternativamente, se puede ensayar la inmunogenicidad del péptido seleccionado a través de una inducción *in vitro* de CTL's, por medio de métodos conocidos (tal como se describe más adelante para la inducción *ex vivo* de CTL's. El principio del método llevado a cabo en varias etapas para la elección de péptidos, que son capaces de provocar una respuesta inmunitaria celular, se describe en el documento de solicitud de patente internacional WO 97/30721, a cuya divulgación se hace referencia expresamente por esta solicitud. 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 las moléculas de MHC-I o MHC-II, es decir péptidos que se derivan inalteradamente de R11, se pueden realizar variaciones con ayuda de los requisitos mínimos en lo referente a las posiciones de anclaje y longitud, indicados sobre la base la secuencia original de péptidos, siempre y cuando que mediante estas variantes no solamente no se perjudique sino que preferiblemente se aumente la inmunogenicidad efectiva del péptido, que se compone de su afinidad de fijación a la molécula de MHC y de su capacidad para estimular receptores de células T. En este caso, se utilizan por lo tanto péptidos, o equivalentes a péptidos, artificiales, que se han proyectado 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 establecen los epítomos de ligandos y MHC-I ó MHC-II o bien su variación, realizada p.ej. de acuerdo con el principio descrito por Rammensee y colaboradores, 1995. La longitud del péptido corresponde, en el caso de su adaptación a moléculas de MHC-I, preferiblemente a una secuencia mínima de 8 a 10 aminoácidos con los necesarios aminoácidos de anclaje.

Eventualmente, el péptido puede ser prolongado también en el extremo terminal de C y/o en el extremo terminal de N, siempre y cuando que esta prolongación no perjudique a la capacidad de fijación a la molécula de MHC, o que

el péptido prolongado pueda ser tratado a escala celular para dar la secuencia mínima.

Los péptidos modificados se comprueban después de ello en cuanto a su reconocimiento por los TIL's ("*tumor-infiltrating lymphocytes*"), en cuanto a inducción de CTL's así como en cuanto a fijación acrecentada a MHC e inmunogenicidad, tal como ha sido descrito por Parkhurst y colaboradores, 1996, y por Becker y colaboradores, 1997.

Otro método apropiado dentro del marco del presente invento para el hallazgo de péptidos con inmunogenicidad más fuerte que la de los péptidos de R11 naturales, consiste en el escrutinio de bibliotecas de péptidos con CTL's, que reconocen a los péptidos de R11 que se presentan por naturaleza en tumores, como fue descrito por Blake y colaboradores, 1996; en este contexto, se propone la utilización de bibliotecas combinatorias de péptidos a fin de proyectar moléculas, que imitan a los epítomos para tumores reconocidos por CTL's restringidos a MHC-I.

El polipéptido de R11 del presente invento, o bien los fragmentos o péptidos inmunógenos que se derivan de éstos, se pueden preparar por vía recombinante o mediante síntesis de péptidos, tal como se describe en el documento WO 96/10413, a cuya divulgación se hace referencia por la presente. Para la preparación por vía recombinante, la correspondiente molécula de ADN se introduce de acuerdo con métodos clásicos en un vector de expresión, se transfecta dentro de una célula hospedante apropiada, la hospedante se cultiva en apropiadas condiciones de expresión y la proteína se purifica. Para la síntesis química de péptidos de R11 se pueden utilizar los métodos habituales, p.ej. los sintetizadores de péptidos automáticos, obtenibles en el comercio.

Alternativamente a los péptidos de R11 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 que se refiere a la utilizabilidad terapéutica en una vacuna contra tumores, se aplican los mismos métodos que antes se han señalado para los péptidos de R11 naturales o equivalentes a péptidos de R11.

El TAA con la denominación R11 de acuerdo con el presente invento, y los fragmentos de proteínas, péptidos o equivalentes a péptidos o miméticos de péptidos, que se derivan de éste, se pueden emplear en la terapia del cáncer, p.ej. a fin de inducir una respuesta inmunitaria contra células de tumores, que expresan

los correspondientes determinantes de antígenos. Preferiblemente, se utilizan para la terapia de tumores positivos para R11, especialmente en los casos de carcinomas de mama, células renales y páncreas.

La respuesta inmunitaria en forma de una inducción de CTL's puede ser
5 producida *in vivo* o *ex vivo*.

Para la inducción *in vivo* de CTL's, a un paciente, que sufre de una enfermedad tumoral asociada con TAA's, se le administra una composición farmacéutica, que contiene como componente activo el TAA R11 o fragmentos o péptido(s) derivados de ellos, teniendo la cantidad de TAA (péptido) que ser suficiente a fin de conseguir
10 una respuesta eficaz de CTL's al tumor que lleva los antígenos.

El invento concierne por consiguiente en un aspecto adicional a una composición farmacéutica para la administración por vía parenteral, tópica, oral o local. Preferiblemente, la composición sirve para la administración por vía parenteral, p.ej. para la aplicación subcutánea, intradérmica o intramuscular. Los TAA/péptidos
15 de R11 están disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. La composición puede contener, además de ello, sustancias coadyuvantes usuales, tales como tampones, etc. Los TAA/péptidos de R11 se pueden utilizar a solas o en combinación con adyuvantes, p.ej. el adyuvante incompleto de Freund, saponinas, sales de aluminio o, en una forma preferida de
20 realización, policationes tales como poliarginina o polilisina. Los péptidos pueden ser fijados también a componentes que ayuden a la inducción de CTL's o a la activación de CTL's, p.ej. a péptidos de células T cooperantes, lípidos o liposomas, o se administran en común con estas sustancias y/o en común con sustancias estimuladoras de inmunidad, p.ej. citoquinas (IL-2, IFN- γ). Los métodos y las formulaciones, que
25 se adecuan para la preparación y la 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 fragmentos de R11 o los péptidos de R11, se pueden utilizar también para provocar una respuesta *ex vivo* de CTL's. Una respuesta *ex vivo* de CTL's a un tumor
30 que expresa las dos proteínas posibles de R11, es inducida incubando las células precursoras de CTL's conjuntamente con APC's y péptidos de R11 o una proteína de R11. Luego se dejan expandir los CTL's activados, después de lo cual se administran de nuevo al paciente. Alternativamente, se pueden cargar APC's con péptidos de R11, lo cual puede conducir a una activación eficiente de reacciones inmunitarias

celulares contra tumores positivos para R11 (Mayordomo y colaboradores, 1995; Zitvogel y colaboradores, 1996). Un método apropiado para cargar péptidos sobre células, p.ej. células dendríticas, se divulga en el documento WO 97/19169.

En una forma de realización del invento, se utiliza una combinación de varios
5 diferentes péptidos de R11 o equivalentes a péptidos de R11. En otra forma adicional de realización, se combinan péptidos de R11 con otros péptidos derivados de TAA's. La elección de péptidos para tales combinaciones se realiza en atención a la determinación de diferentes tipos de MHC, para abarcar una población lo más amplia que sea posible de pacientes, y/o se ajusta a un espectro lo más amplio que sea
10 posible de indicaciones, combinando péptidos de varios diferentes antígenos de tumores. El número de los péptidos en una composición farmacéutica puede fluctuar a lo largo de un amplio margen, típicamente una vacuna utilizable a escala clínica contiene de 1 a 15, preferiblemente 3 a 10 péptidos diferentes.

Los péptidos conformes al invento se pueden emplear también como reactivos
15 para diagnóstico.

Por ejemplo, los péptidos se pueden utilizar para ensayar la sensibilidad de un paciente a la respuesta inmunitaria humoral o celular provocada por el péptido inmunógeno. Con ello existe la posibilidad de mejorar un protocolo de tratamiento. Por ejemplo, dependiendo de la forma de presentación del TAA (péptido, proteína
20 total o vacuna de ADN) se puede investigar el aumento de células T precursoras en los PBL's, que presentan una reactividad contra el epítipo para péptido definido (Robbins y Kawakami, 1996, así como las referencias allí citadas). Además, los péptidos o la proteína total, o los anticuerpos dirigidos contra el TAA, se pueden utilizar para caracterizar la evolución patológica de un tumor positivo para R11 (p.ej.
25 mediante análisis inmuno-histoquímicos de un tumor primario y de las metástasis). Tal estrategia ya se ha manifestado múltiples veces como satisfactoria, p.ej. la detección del receptor de estrógenos como fundamento de decisión para una terapia endocrinológica en el caso del cáncer de mama; el c-erbB-2 como marcador relevante en el pronóstico y en la evolución terapéutica en el caso del cáncer de mama
30 (Ravaioli y colaboradores, 1998; Revillion y colaboradores, 1998); el PSMA (de "*prostate specific membrane antigen*" = antígeno de membrana específico para la próstata) como marcador para células epiteliales del carcinoma de próstata en el suero, o por empleo de un anticuerpo monoclonal marcado con ¹¹¹In contra un PSMA en el caso de la inmuno-escintigrafía en un carcinoma de próstata (Murphy y

colaboradores, 1998 y las referencias allí incluidas); CEA ("carcinoembryonic antigen" = antígeno carcino-embriónico) como marcador serológico para el pronóstico y la evolución en el caso de pacientes con carcinoma colorrectal (Jessup y Loda, 1998).

5 El presente invento concierne en otro aspecto adicional a moléculas aisladas de ADN, que codifican una proteína con las propiedades inmunógenas de R11 o fragmentos de ella.

En otro aspecto adicional, el presente invento concierne a una molécula aislada de ADN, que tiene la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:
10 1 o un polinucleótido, que se hibrida con esta molécula de ADN en condiciones rigurosas

Por "condiciones rigurosas" se entiende p.ej.: incubar durante una noche a 65°C - 68°C con 6x SSC (1x SSC = NaCl 150 mM, citrato de tri-sodio 15 mM, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,2%, ADN de esperma de salmón 50 µg/ml, a
15 continuación de ello lavar dos veces durante 30 min con 2x SSC, SDS al 0,1% a 65°C, una vez durante 30 min con 0,2x SSC, SDS al 0,1% a 65°C, y de modo eventual enjuagar finalmente con 0,1x SSC, SDS al 0,1% a 65°C.

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

Las moléculas de ADN conformes al invento, o fragmentos de ellas, codifican (poli)péptidos con la denominación R11 que constan de o contienen la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2; o bien codifican fragmentos de proteínas
25 o péptidos que se derivan de ellos; con ello se abarcan conjuntamente las moléculas de ADN, que presentan desviaciones con respecto de la secuencia representada en SEQ ID NO: 1 causadas por la degeneración del código genético.

El invento concierne también a moléculas de ADN, que por mutación conducen a un intercambio de aminoácidos en la secuencia de proteína representada
30 en SEQ ID NO: 2, siempre y cuando que codifiquen un derivado de R11 o bien fragmentos o péptidos con las propiedades inmunógenas deseadas para la utilización como vacuna contra tumores.

Las moléculas de ADN de R11 del presente invento, o los correspondientes ARN's, que también son objeto del presente invento, se emplean para la inmunotera-

pia de enfermedades de cáncer, igual que los (poli)péptidos codificados por ellas.

En una forma de realización del invento, se utilizan moléculas de ADN, que codifican polipéptidos de R11 naturales. Alternativamente al ADNc de R11 natural o a fragmentos de éste, se pueden utilizar derivados modificados. Éstos abarcan

5 secuencias con modificaciones, que codifican una proteína (o un fragmento de ella) o péptidos con inmunogenicidad más intensa, siendo válidas para las modificaciones en el plano del ADN las mismas consideraciones que para los péptidos antes descritos. Otro tipo de la modificación es la yuxtaposición de numerosas secuencias, que codifican péptidos relevantes inmunológicamente, a modo de una sarta de perlas

10 ("*string-of-beads*"; Toes y colaboradores, 1997). Las secuencias pueden también ser modificadas agregando elementos auxiliares, p.ej. funciones que garantizan una entrega y un tratamiento más eficientes del inmunógeno (Wu y colaboradores, 1995). Por ejemplo, agregando una secuencia de localización en el retículo endoplasmático ("*ER targetting sequence*") se puede elevar el tratamiento y por consiguiente la

15 presentación y a fin de cuentas la inmunogenicidad del antígeno.

El presente invento concierne en un aspecto adicional a una molécula de ADN recombinante, que contiene el ADN de R11.

Las moléculas de ADN de R11 del presente invento, preferiblemente en forma recombinante, se pueden administrar como plásmidos, directamente o como

20 constituyente de un virus recombinante, o de una bacteria. En principio, cualquier método de terapia génica para la inmunoterapia de un cáncer sobre la base de ADN ("*vacunas de ADN*") se puede aplicar al ADN de R11, y concretamente tanto *in vivo* como también *ex vivo*.

Ejemplos de la administración *in vivo* son la inyección directa, o bien por vía

25 intramuscular o mediante una pistola de genes ("*gene gun*"), de un ADN "desnudo" del que se ha mostrado que conduce a la formación de CTL's contra antígenos de tumores. Ejemplos de organismos recombinantes son el virus de Vaccinia, adenovirus o *Listeria monocytogenes* (una recopilación fue dada por Coulie, 1997). Por lo demás, se pueden utilizar soportes o vehículos sintéticos para ácidos nucleicos, tales como

30 lípidos catiónicos, microesferas, microbolitas o liposomas para la administración *in vivo* de moléculas de ácidos nucleicos, que codifican un péptido de R11. Similarmente a como para los péptidos, se pueden administrar conjuntamente diferentes sustancias auxiliares, que refuerzan la respuesta inmunitaria, p.ej. citoquinas, o bien en formas de proteínas o de plásmidos que codifican a éstas. La aplicación se puede

combinar eventualmente con métodos físicos, p.ej. el de electroporación.

Un ejemplo de la administración *ex vivo* es la transfección de células dendríticas, como fue descrito por Tuting, 1997, o de otras APC's, que pasan a aplicarse como vacuna celular contra el cáncer.

5 El presente invento concierne por consiguiente, en otro aspecto adicional, a la utilización de células que expresan R11, o bien de por sí mismas o, en una forma eventualmente modificada, después de una transfección con la secuencia correspondientemente codificadora, para la preparación de una vacuna contra el cáncer.

10 El invento concierne, en otro aspecto adicional, a anticuerpos contra R11 o fragmentos de ellos. Anticuerpos se pueden obtener de un modo habitual por inmunización de animales, especialmente conejos, mediante inyección del antígeno, o de fragmentos de éste, y subsiguiente purificación de la inmunoglobulina.

Los anticuerpos anti-R11 monoclonales se pueden obtener de acuerdo con
15 protocolos clásicos según el principio descrito por Köhler y Milstein, 1975, inmunizando animales, especialmente 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 inmunológicos clásicos en cuanto a anticuerpos monoclonales anti-
20 R11. Para el empleo terapéutico o diagnóstico en un ser humano, estos anticuerpos animales pueden ser eventualmente quimerizados de un modo habitual (Neuberger y colaboradores, 1984, Boulianne y colaboradores, 1984) o humanizados (Riechmann y colaboradores, 1988, Graziano y colaboradores, 1995).

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-R11 (o sus fragmentos) se
25 pueden obtener también de 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).

30 Los anticuerpos anti-R11 conformes al invento se pueden emplear para finalidades de diagnóstico en análisis inmuno-histoquímicos.

En un aspecto adicional, el invento concierne a la utilización de anticuerpos específicos para R11, con el fin de llevar a cualesquiera sustancias deseadas de manera selectiva a o dentro de un tumor, que expresa R11. Ejemplos de tales

sustancias son agentes citotóxicos o núclidos radiactivos, cuyo efecto consiste en dañar al tumor en el lugar de su localización. Por causa de la expresión de R11 específica para tumores, no son de esperar en este caso efectos colaterales de ningún tipo, o solamente escasos efectos colaterales. En otro aspecto adicional, con ayuda de anticuerpos de R11 se pueden aprovechar las sustancias para la visualización de tumores, que expresan R11. Esto es útil para el diagnóstico y la valoración de la evolución de la terapia. Aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de anticuerpos, que entran en cuestión para anticuerpos anti-R11, están descritas en el documento WO 95/33771.

- 10 El TAA con las denominación R11 según 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 R11, especialmente en el caso de los carcinomas de mama, células renales y páncreas.

Vista de conjunto de las figuras:

- Figura 1: Transcripción de R11 en tejidos de tumores y normales;
20 RT-PCR semicuantitativa
- Figura 2: Transcripción de R11 en tejidos de tumores y tejidos normales:
PCR cualitativa
- Figura 3: Análisis por transferencia Northern de R11 en tejidos normales
- Figura 4: Transcripción de R11: RT-PCR cualitativa a partir del ARN de líneas de
25 células de tumores humanas
- Figura 5: Región modificada del vector pC3.1(+).

Ejemplo 1

- 30 Cultivo de células de la línea celular MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 derivada de un carcinoma de páncreas humano y aislamiento del ARN poliA⁺

La línea celular MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 se deriva de un carcinoma de páncreas humano (MZ.PC2); ésta se obtuvo de la siguiente manera: en primer lugar, las células de tumores se hicieron pasar una vez por un ratón y se eligió un clon para estudios ulteriores (MZ.PC 2m7#1). Este clon se transfectó en condiciones clásicas (Ausubel

y colaboradores, 1994) con un vector eucariótico (pEF-BOS; el promotor procede del gen EF-1alfa humano; marcador de selección: puromicina; Mizushima y Nagata, 1990), que contiene el ADNc del gen B7.1 humano (Selvakumar y colaboradores, 1992). Se eligió un clon MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 y se cultivó en crecimiento dentro
5 de frascos para cultivo celular T150. Como medio nutriente sirvió el RPMI 1640 (Gibco más 4 g/l de glucosa) con 10% de suero de ternero fetal desactivado por calor y L-glutamina 2 mM. Cada 3 a 4 días, las células se disociaron por tripsinación en 1:5 para la propagación. Después de haber alcanzado una confluencia de aproximadamente 80% se emplearon para la cosecha de las células por cada frasco de cultivo
10 celular T150 4 ml de una solución de tripsina (datos por 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 una sal sódica de EDTA; pH-7,2-7,4). En total se emplearon 2x10⁷ células para el aislamiento del ARN de acuerdo con el protocolo del fabricante (RNeasy Minikit, QIAgen). Partiendo de aproximadamente 100 µg de ARN total para
15 el aislamiento del ARN poliA⁺ mediante el estuche de ensayo Oligotex Kit (QIAgen) se procedió correspondientemente al protocolo del fabricante. A continuación de ello, partiendo de aproximadamente 0,5 mg de ARN poliA⁺, se llevó a cabo la síntesis de ADNc de acuerdo con los datos del fabricante (protocolo de Clontech Marathon).

20 Ejemplo 2

Análisis de diferencia representativa ("Representational Difference Analysis"; RDA) de la línea de células de carcinoma de páncreas MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 frente a un conjunto de 11 tejidos normales

Partiendo de aproximadamente 0,5 µg de poliA(+) de la línea de células de
25 tumor de páncreas MZ.PC2 m7#1 B7.1#3 y de un conjunto a base de 2,5 µg de ARN poliA(+) de 11 tejidos normales (Clontech) de médula ósea, corazón, riñón, hígado, pulmón, páncreas, músculo del esqueleto, bazo, timo, intestino delgado y estómago, se llevó a cabo el estudio por RDA (Diatchenko y colaboradores; Hubank y Schatz) mediando utilización del estuche PCR-select[®] Kit (Clontech, Palo Alto) de modo
30 correspondiente al protocolo del fabricante; en tal caso se utilizó el ARN de la línea de células de tumor de páncreas como "tester" y el del conjunto de tejidos normales como "driver", correspondientemente al protocolo del fabricante. Al contrario que el protocolo original, después de la síntesis de ADNc bicatenario mediante oligo-dT, se cortó el ADNc con 6 enzimas de restricción: *EcoRV*, *NaeI*, *NruI*, *ScaI* (Promega), *SspI*,

StuI (TaKaRa) en el tampón A de Promega durante 2 horas a 37°C, y después de haber aumentado la concentración de NaCl a 150 mM se cortó durante otras 2 horas a 37°C. El empleo de esta mezcla de 6 diferentes enzimas de restricción permitió la generación de fragmentos de ADNc con una longitud de aproximadamente 800 pb, que pasaron a emplearse para el análisis de diferencia representativa.

Partes iguales de "ADNc de tester" se ligaron o bien con los adaptadores A ó B y a continuación se utilizaron por separado con un exceso de "ADNc de driver" a 68°C. Después de ello, las dos tandas se reunieron y se sometieron a una segunda hibridación con "ADNc de driver" desnaturalizado de nueva aportación. Los ADNc's específicos para "tester" enriquecidos se amplificaron exponencialmente a 72°C a continuación por medio de una PCR con cebadores del estuche, específicos para los adaptadores A ó B, con un tiempo de elongación de 2 minutos, en 27 ciclos (10'' a 94°C, 30'' a 66°C, 2' a 72°C). Para un enriquecimiento adicional, una parte alícuota de esta reacción se sometió a una segunda PCR con cebadores específicos desplazados hacia dentro ("*nested*") del estuche con un tiempo de elongación de 2 minutos a 72°C, en 10 ciclos (10'' a 94°C, 30'' a 66°C, 2' a 72°C). El producto resultante de esta reacción se ligó en 3 diferentes vectores de pCR3.1(+) modificados propiamente (InVitrogen): el vector (1. ORF), el vector (2. ORF) y el vector (3. ORF) (Figura 5: CMV = citomegalovirus; BGH = hormona de crecimiento bovina; ORF = cuadro de lectura abierto) y a continuación se transformó en el seno de *E. coli* competentes (OneShot® Invitrogen). Estos vectores hacen posible la expresión en células eucarióticas en 3 diferentes cuadros de lectura.

Para la construcción de los 3 vectores, el vector pCR3.1(+) (InVitrogen) se cortó con *NheI* e *HindIII* (Promega) y se ligó en cada caso con un oligómero de dsDNA (ADN bicatenario), que se había preparado mediante el reagrupamiento en cada caso de dos oligómeros de ssDNA (= ADN monocatenario) (SEQ ID NO: 3 y 4; vector ORF1) o (SEQ ID NO: 5 y 6; vector ORF2) o (SEQ ID NO: 7 y 8; vector ORF3), de acuerdo con protocolos clásicos (p.ej. Ausubel y colaboradores, 1994; Sambrook y colaboradores, 1989). Los 3 tipos de vectores poseen un codón de iniciación y un sitio de clonación para la expresión en un cuadro de lectura en cada caso distinto de los otros dos vectores.

La transformación de *E. coli* competente (OneShot®, Invitrogen) con el ADNc de la biblioteca substractiva de ADNc, llevada a cabo en tres tandas (con los vectores 1. ORF, 2. ORF y 3. ORF) con el ADNc de la biblioteca substractiva de ADNc

proporcionó aproximadamente 9.600 clones. Éstos fueron comprobados mediante análisis por PCR en cuanto a la presencia y a la longitud del inserto de ADNc. En este caso se procedió de la siguiente manera: los 9.600 clones se cultivaron en bloques de 96 pocillos en un medio LB-Amp durante 48 h a 37°C. A continuación, partes
 5 alícuotas de 5 µl de las suspensiones de *E. coli* en 500 µl del tampón TE se calentaron a 100°C durante 10 minutos y 1,5 µl de éstas se utilizaron como carga preliminar para una PCR, en la que el inserto del vector había sido amplificado con cebadores flanqueadores (SEQ ID NO: 9 y 10), en 35 ciclos (1' a 94°C, 1' a 55°C, 2' a 72°C). Los productos de la PCR se comprobaron mediante electroforesis en gel
 10 de agarosa y coloración con bromuro de etidio. Los cultivos bacterianos remanentes se almacenaron a -80°C como cultivos de reserva en glicerol.

Con ello se obtuvo una biblioteca por sustracción de ADNc a base de 3.450 clones individuales, que se presentaban como cultivos de reserva en glicerol de *E. coli* y cuya longitud de inserto se conocía mediante la electroforesis en gel de agarosa.
 15 De este modo, tal como se esperaba, se pudo comprobar una longitud media de aproximadamente 800 pb de los fragmentos de ADNc insertados.

Ejemplo 3

Secuenciación del ADNc y anotación de clones de la biblioteca substractiva de ADNc de la línea de células de tumor de páncreas MZ.PC2 m7#1 B7.1#3
 20

El ADN de plásmido de 50 clones seleccionados arbitrariamente a partir de la biblioteca substractiva de ADNc se aisló correspondientemente a los datos del fabricante (QIAGEN) y se secuenció en un aparato ABI-Prism de acuerdo con el método de Sanger. Las secuencias así determinadas se anotaron mediante una
 25 búsqueda BLAST (National Center for Biotechnology Information) y se sometieron a comparaciones de los EST en el banco de datos. Esto permitió la identificación de 38 genes conocidos y 12 genes desconocidos. Para estos últimos existían solamente entradas de EST's. Para los 12 genes desconocidos se llevó a cabo una estimación del perfil de expresión: de este modo se comprobó, para todos los EST's en el banco
 30 de datos con una identidad > 95% (BLAST) con respecto a la secuencia determinada experimentalmente, el tejido de partida para la correspondiente biblioteca de ADNc. Se llevó a cabo una clasificación en i) tejido normal crítico, ii) tejido fetal, "prescindible" y privilegiado inmunológicamente, e iii) tumores y líneas de células de tumores. Sobre la base de este "perfil virtual de ARNm" se seleccionaron 4 clones (R2, R8,

R11 y R12) para un análisis experimental ulterior.

Ejemplo 4

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

5 Entre 2 y 5 μ g del ARN total procedente de tejidos de tumores y normales se transcribieron inversamente mediante SuperScriptII (GibcoBRL) o AMV-RT (Promega) correspondiendo a las recomendaciones del fabricante. Para cada muestra de ADN individual se llevó a cabo una segunda tanda sin transcriptasa inversa como testigo de control para la contaminación por ADN cromosomal. La calidad y la cantidad de los ADNc's se comprobó con cebadores específicos para β -actina (SEQ ID NO: 13 y 14) y cebadores específicos para GAPDH (SEQ ID NO: 15 y 16) después de 30 y 35 ciclos (1' a 95°C, 1' a 55°C, 1' a 72°C). Los 4 genes candidatos se analizaron análogamente con cebadores en cada caso específicos. Los productos de PCR se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa y coloración con bromuro de etidio. En tal caso un candidato, que se designó como "R11", mostró después de 35 ciclos con cebadores específicos para R11 (SEQ ID NO: 11 y 12) un perfil de transcripción de tumor/testículo relativamente específico; la RT-PCR semicuantitativa de ARN procedente de carcinoma de mama, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de epitelio escamoso de pulmón, carcinoma de riñón, carcinoma de colon, corazón, pulmón, hígado, riñón, colon, bazo y testículos se representa en la Figura 1. Otra PCR cualitativa adicional de ADNc procedente de tejido de pacientes de 3 tumores de páncreas humanos con los mismos cebadores específicos para R11 (SEQ ID NO: 11 y 12) mostró la expresión en tumores de páncreas humanos (Figura 2). Además, se llevó a cabo una PCR cualitativa adicional de los ADNc procedentes de diferentes líneas de células tumorales de tumores de pulmones humanos (LC 6, 16), de vesículas biliares humanas (GB 1) y de páncreas humanos (PC 1, 2) así como dos melanomas (Mel 2, 7) con los mismos cebadores específicos para R11 (SEQ ID NO: 11 y 12), que permitió reconocer una clara expresión en todas las líneas de células de tumores (Figura 4). En el caso de este análisis se procedió de acuerdo con el protocolo de Perkin Elmer (GeneAmp RNA PCR Kit, #N808-0017). (Reacción de RT (transcriptasa inversa): (1x) 15' a 42°C - 5' a 99°C - 5' a 4°C; reacción de PCR: (35x) 2' a 95°C - 1' a 95°C - 1' a 60°C y (1x) 7' a 72°C - 4°C (Figura 4). Tal como antes se describe, los productos de PCR se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa y coloración con bromuro de etidio. Como marcador del tamaño pasó

a emplearse un marcador del tamaño de 1 kb de Gibco BRL.

Ejemplo 5

Perfil de transcripción de R11 en tejidos normales

- 5 Para el análisis por transferencia Northern se hibridaron "manchas de transferencia Northern de tejidos múltiples humanos" (Clontech, Palo Alto e Invitrogen) con el producto de PCR de R11 con una longitud de aproximadamente 1.000 pb, marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEN, Boston), a 68°C durante 2 h. La visualización se efectuó mediante autorradiografía clásica (Hyperfilm, Amersham).
- 10 La Figura 3 muestra el resultado de estos análisis: de 19 tejidos normales (de páncreas, médula adrenal, glándula tiroidea, corteza adrenal, testículo, timo, intestino delgado, estómago, cerebro, corazón, músculo del esqueleto, colon, bazo, riñón, hígado, placenta, pulmón, leucocitos). Para R11 se muestra en placenta, médula adrenal, corteza adrenal y testículos un transcrito prominente con una longitud de 7,5
- 15 kb. Una banda muy débil de 7,5 kb se puede detectar también en el cerebro. Puesto que todos estos tejidos normales presentan un estado privilegiado inmunitariamente (Streilein, 1995), en una inmunoterapia que se basa en este antígeno puede excluirse un ataque por CTL's.

- Otros transcritos de 3,8 kb y 2,3 kb, que posiblemente constituyen variantes
- 20 de empalme del transcrito de 7,5 kb o que se derivan de un gen homólogo, se identificaron en la médula adrenal y en la corteza adrenal (Figura 3).

Ejemplo 6

Clonación del ADNc de R11

- 25 Para la clonación del ADNc de R11 humano se procedió de la siguiente manera: un análisis BLAST dio como resultado que para la "secuencia original" de R11 (de 796 pb) obtenida por secuenciación en el Ejemplo 3 se pudieron identificar un fragmento solapado AF038197 y un gran número de EST's solapados, tales como p.ej. N42343, W69539, H82474, H51766 y N28313. Partiendo de la secuencia
- 30 AF038197 se encontró con el EstExtractor en el TigemNet (<http://gcg.tigem.it/cgi-bin/uniestass.pl>) un contig (grupo de secuencias de nucleótidos clonadas que son contiguas) que se solapaba con el clon R11. El solapamiento del contig y de la "secuencia original" de R11 de 796 pb se pudo comprobar con un cebador específico para la "secuencia original" de R11 y un cebador situado junto al contig (SEQ ID NO:

17 y 18) procedente de una biblioteca de ADNc de testículos humanos SuperScript® (GibcoBRL) y subsiguiente secuenciación. A partir de la biblioteca de ADNc de testículos humanos SuperScript® se pudieron amplificar mediante una PCR con un cebador específico para R11 (SEQ ID NO: 19) y un cebador específico para el vector (SEQ ID NO: 20) otros fragmentos pertenecientes a R11 mediante utilización del estuche para PCR de ADNc Advantage cDNA PCR Kit (de Clontech) y el protocolo clásico allí descrito. El conocimiento de estas nuevas secuencias hizo posible de nuevo realizar tandas de PCR con cebadores específicos para R11 (SEQ ID NO: 21 y 22) y con el cebador específico para el vector (SEQ ID NO: 20).

10 Para la prolongación adicional del ADNc de R11 se escrutó en las condiciones clásicas de PCR indicadas por el fabricante, un panel de biblioteca de ADNc de escrutinio rápido de testículos humanos (OriGene Technologies, Inc) con cebadores específicos para R11 (SEQ ID NO: 23 y 24). De los pocillos positivos se amplificó una parte alícuota como molde (*template*) para una PCR con un cebador específico para R11 y con un cebador específico para el vector (SEQ ID NO: 25 y 26) mediante utilización del estuche para PCR de ADNc Advantage (Clontech) y con el protocolo clásico allí descrito.

Para el análisis de las secuencias, partes alícuotas de las tandas de PCR se ligaron directamente en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y a continuación se transformaron en el seno de *E. coli* competentes (OneShot®, Invitrogen) y se secuenciaron, tal como se ha descrito en el Ejemplo 3.

La región clonada del ADNc de R11 es de 5.714 pb, realizándose que la presencia de una cola de PoliA en el extremo 3' de la secuencia responde de la compleción del ADNc en esta región. Un cuadro de lectura continuo está representado por el codón de iniciación en la posición 570 y el codón de detención (TAG) en la posición 1.638. Puesto que acerca de este gen no existe ninguna entrada de genes conocidos en el banco de datos, no se puede realizar ninguna información acerca de la función. Un análisis del perfil de proteínas (<http://expasy.ch/prosite/>) proporcionó junto con los dos segmentos ricos en prolina evidentes (posiciones nº 128-141 y 330-351 en SEQ ID NO: 2), motivos potenciales de para dos sitios glicosilación en N (104-107 y 250-253), un sitio de fosforilación de proteína-quinasa C (108-110), cuatro sitios de fosforilación de caseína-quinasa II (99-102, 165-168, 198-201, 273-276), dos sitios de miristoilación en N (21-26, 309-314) y una región con similitud con respecto al centro activo de aspartato-proteinasas eucarióticas y víricas (16-27).

222

Ejemplo 7

Péptidos de fijación a MHC potenciales en la región que codifica la parte terminal de C de R11

- 5 Epítomos potenciales para péptidos dentro de la región codificadora del fragmento terminal de C de R11 según (SEQ ID NO: 2) se establecieron mediante los algoritmos descritos por Parker y colaboradores, 1994, basándose en 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
- 10 identificaron péptidos candidatos 9-meros, de los cuales es de esperar que se fijen a las correspondientes moléculas de HLA y por lo tanto constituyan epítomos para CTL's inmunógenos; los péptidos determinados se enumeran en la Tabla 1. Mediante un modo análogo de proceder se pudieron determinar otros epítomos potenciales de péptidos para otros tipos de HLA o péptidos 8 y 10 meros.

225
223

Tabla 1

Candidatos a péptidos inmunógenos del fragmento terminal de C de R11
(356 aminoácidos)

5

	Posición inicial en SEQ ID NO: 2	Secuencia	HLA
	1	MLQIHLPGR	HLA-A3
10	4	IHLPGRHTL	HLA-A*0201, HLA-B14
	5	HLPGRHTLF	HLA-A3
15	31	YVAQNGIPL	HLA-B7
	39	LRIKDWPII	HLA-B14
	46	ILVEAIDGR	HLA-A3
20	53	GRPIASGPV	HLA-B14
	64	ETHDLIVDL	HLA-B14
25	71	DLGDHREVL	HLA-A*0201, HLA-B7, HLA-B14
	73	GDHREVLSF	HLA-B*4403
	85	QSPFFPVVL	HLA-B7
30	92	VLGPRWLSA	HLA-A*0201
	97	WLSAHPNI	HLA-A*0201
35	110	RSIVFDSEY	HLA-B*4403
	112	IVFDSEYCR	HLA-A3

226
224

5	134	PPPAPQPPL	HLA-B7
	141	PLYYPVDGY	HLA-A3
	150	RVYQPVRYY	HLA-A3
	152	YQPVRYYYYV	HLA-A*0201
	155	RYYYYVQNV	HLA-B14
10	159	YVQNVYTPV	HLA-A*0201
	169	EHVYPDHRL	HLA-B14
	177	LVDPHIEMI	HLA-A*0201, HLA-A1
15	183	EMIPGAHSI	HLA-A*0201
	189	HSIPSGHVY	HLA-A1, HLA-B*4403
	191	IPSGHVYSL	HLA-B7, HLA-A*0201
	198	SLSEPEMAA	HLA-A*0201
	199	LSEPEMAAL	HLA-A1
20	202	PEMAALRDF	HLA-B*4403
	203	EMAALRDFV	HLA-A*0201
	206	ALRDFVARN	HLA-A*0201
	211	VARNVKDGL	HLA-B7
25	223	TIAPNGAQV	HLA-A*0201
	224	IAPNGAQVL	HLA-B7
	231	VLQVKRGWK	HLA-A3

227
225

	232	LQVKRGWKL	HLA-A*0201, HLA-B14
5	257	YPRLSIPNL	HLA*7
	266	EDQAHLATY	HLA-B*4403
	270	HLATYTEFV	HLA-A*0201
10	306	GRDGQGRSL	HLA-B14
	307	RDGQGRSLY	HLA-B*4403
	308	DGQGRSLYV	HLA-B14
15	313	SLYVPVMIT	HLA-A*0201, HLA-A3.
	320	ITWNPHWYR	HLA-A3
20			

Bibliografía

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G., Struhl, K. (coordinadores de edición), (1994), Vol. 1+2 „Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley&Sons. Inc.

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.

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

15 Boon T, (1998), Tumor antigens recognized by cytolytic T cells. Cancer Vaccine Week – Interantional Symposium, Nueva York, Oct. 1998; resumen S01

Boulianne, G. L., y colaboradores (1984), Nature 312, 643-646

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

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

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

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

30

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

229
227

- Cox, AL, Skipper, J, Chen, Y, Henderson, RA, Darrow, TL, Shabanowitz, J, Engelhard, VH, Hunt, DF, y Slingluff, CL, Jr. (1994), Science 264, 716-719
- 5 Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., y Siebert, P.D. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6025-6030.
- 10 Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., y Mulligan, R. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90, 3539-3543.
- Elble, R., Widom, J., Gruber, A.D., Abdel-Ghany, M., Levine, R., Goodwin, A., Cheng, H.-C., y Pauli, B.U. (1997), J. Biol. Chem. 272, 27853-27861.
- 15 Emini, EA, Hughes, J, Perlow, D, y Boger, J (1985), J. Virol. 55, 836-839
- Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G., y Rammensee, H-G (1991), Nature 351, 290-296.
- 20 Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H.I., Simons, J.W., Karasuyama, H., Vogelstein, B., y Frost, P. (1990), Cell 60, 397-403.
- Gansbacher, B., Zier, K., Daniels, B., Cronin, K., Bannerji, R., y Gilboa, E. (1990), J. Exp. Med. 172, 1217-1224.
- 25 Gaudi C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F (1999), J Immunol 162:1730-1738
- Graziano, R.F., y colaboradores (1995), J. Immunol. 155, 4996-5002
- 30 Griffiths, A.D., y colaboradores (1994), EMBO J. 13, 3245-3260
- Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, y Barnetson RS (1995), World J. Surg. 19, 352-358

228
228

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

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

5

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.

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

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

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

20

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

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

25

Kruif, J., y colaboradores (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3938-3942

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

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

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

231
229

- Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P (1997) , J Exp Med 186:785-793
- Marchand M, Weynants P, Rankin E y colaboradores (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., Ildstad, S.T., Kast, W.M., DeLeo, A.B., y Lotze, M.T. (1995), Nature Medicine 1, 1297-1302.
- McGuinness, B.T., y colaboradores (1996), Nature Biotechnol. 14, 1149
- Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM (1996), Curr. Opin. Immunol. 8, 651-657
- Mizushima, S. y Nagata, S. (1990), Nucleic Acids Res. 18, 5322.
- Murphy, G.P., Elgamal, A.A., Su, S.L., Bostwick, D.G., y Holmes, E.H. (1998), Cancer 83, 2259-2269
- Neuberger, M.S., y colaboradores (1984), Nature 312, 604-608
- Pardoll, D. M.(1998), Nature Medicine 4, 525-531
- Parker, K. C., M. A. Bednarek, y J. E. Coligan. (1994), J. Immunol. 152, 163.
- 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.
- Paterson Y, Ikonomidis G (1996), Curr. Opin. Immunol. 5, 664-669
- 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

232
230

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

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

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

Riechmann, L., y colaboradores (1988), Nature 332: 323-327

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

10

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

Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R.,

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

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

20

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

Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kirlappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel M

25 (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94, 3262-3267

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

Selvakumar, A., Mohanraj, B.K., Eddy, R.L., Shows, T.B., White, P.C., y Dupont, B.

30 (1992) Immunogenetics 36, 175-181.

- Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-F., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., y Chisari, F.V. (1994), J. Immunol. 153, 5586-5592.
- 5
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.
- Streilein, J.W. (1995), Science 270, 1158-1159.
- 10
Tepper, R.I., Pattengale, P.K., y Leder, P. (1989), Cell 57, 503-512.
- Tighe H, Corr, M, Roman M, y Raz E (1998), Immunol. Today 19, 89-97
- 15
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, 14660-14665
- Tuting, T., DeLeo, A.B., Lotze, M.T., y Storkus, W.J., (1997), Eur. J. Immunol. 27, 2702-2707,.
- 20
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
- 25
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
- van der Burg, S.H., y colaboradores (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, edición coordinada por M. Maio, Amsterdam: IOS, 1996, páginas 165-173

- van Elsas, A., Aarnoudse, C., van der Minne, C.E., van der Spek, C.W., Brouwenstijn, N., Osanto, S., y Schrier, P.I. (1997), J. Immunother. 20, 343-353.
- Vaughan, T.J., y colaboradores (1998), Nature Biotechnol. 16, 535-539
- 5 Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, y Kinzler, KW (1995), Science 270, 484-487
- Wang, L., et al., (1997), Mol. Immunol. 34, 609-618
- 10 Wang, RF (1997), Mol. Med. 3, 716-731
- Winter, G., y colaboradores (1994), Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455
- 15 Wölfel T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, y Falk, K (1994), Int. J. Cancer 57, 413-418
- Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Büschenfelde KH, Beach D (1995), Science 269:1281-1284
- 20 Wu, T.C., Guarnieri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Viscidi, R.P., Levitsky, H.I., Hedrick, L., Cho, K.R., August, J.T., y Pardoll, D.M. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11671-11675.
- 25 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.
- Zhu, D., Cheng., C.-F., y Pauli, B.U. (1992), J. Clin. Invest. 89, 1718-1724.

233
233

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

5 <120> Antígeno asociado a tumores R11

<130> 12-111

<140>

10 <141>

<160> 70

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 5714

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(569)

25 <223> putativo

<220>

<221> CDS

<222> (570)..(1640)

30

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1641)..(5714)

35 <400> 1

cttgagacct caagogaagg ttgcaacgca agatcagagc tgcgcaaggc atggggtctg 60
tcctcgacta ctcaatgctt tccagatgat tgcccaggac ctggattgga aocagcctgc 120
gctgattgac cagtaccaog agggcctcag ogaccacatt caggaggagc tctcccaogt 180
ogaggctogc aagtcgctgt ctgctctgat tgggcagtgc attcacattg agagaaggct 240
ggccagggct gctgcagctc gogagocaog ctogccacc cgggogctgg tgttgctca 300
cattgcaagc caccaccagg tagatcaacc gagcgggtgg gaggtgcccg catgogcctg 360
aocaggaag aaaaagaaag aocagaaag ctgaacctgt gctctactg tggaaacagga 420
ggtcactacg ctgacaattg tcctgccaag gctcaaagt ctlogccggc gggaaactcc 480
cggcccccgc tgtagagga octtcagoga cggggccaga aataataagg tcccccaag 540

234

- 40 -

	atgatgocctc atctccacac ttgcaagtg atg ctc cag att cat ctt cgg ggc	593
	Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly	
	1 5	
5	aga cac acc ctg ttc gtc cga gcc atg atc gat tct ggc gct tct ggc	641
	Arg His Thr Leu Phe Val Arg Ala Met Ile Asp Ser Gly Ala Ser Gly	
	10 15 20	
10	aac ttc att gat cac gaa tat gtt gct caa aat gga att cct cta aga	689
	Asn Phe Ile Asp His Glu Tyr Val Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu Arg	
	25 30 35 40	
15	atc aag gac tgg cca ata ctt gtg gaa gca att gat ggg cgc ccc ata	737
	Ile Lys Asp Trp Pro Ile Leu Val Glu Ala Ile Asp Gly Arg Pro Ile	
	45 50 55	
20	gca tgg ggc cca gtt gtc cac gaa act cac gac ctg ata gtc gac ctg	785
	Ala Ser Gly Pro Val Val His Glu Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu	
	60 65 70	
25	gga gat cac cga gag gtg ctg tca ttt gat gtg act cag tct cca ttc	833
	Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser Phe Asp Val Thr Gln Ser Pro Phe	
	75 80 85	
30	ttc cct gtc gtc cta ggg cgg cgc tgg ctg agc gca cat gat ccc aat	881
	Phe Pro Val Val Leu Gly Pro Arg Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn	
	90 95 100	
35	atc aca tgg agc act cga tct atc gtc ttt gat tct gaa tac tgc cgc	929
	Ile Thr Trp Ser Thr Arg Ser Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg	
	105 110 115 120	
40	cac cac tgc cgg atg tat tct cca ata cca cca tgg ctc cca cca cca	977
	His His Cys Arg Met Tyr Ser Pro Ile Pro Pro Ser Leu Pro Pro Pro	
	125 130 135	
45	gca cca caa cgg cca ctc tat tat cca gta gat gga tac aga gtt tac	1025
	Ala Pro Gln Pro Pro Leu Tyr Tyr Pro Val Asp Gly Tyr Arg Val Tyr	
	140 145 150	
50	caa cca gtg agg tat tac tat gtc cag aat gtg tac act cca gta gat	1073
	Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr Val Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val Asp	
	155 160 165	
55	gag cac gtc tac cca gat cac cgc ctg gtt gac cct cac ata gaa atg	1121
	Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met	
	170 175 180	
60	ata cct gga gca cac agt att ccc agt gga cat gtg tat tca ctg tcc	1169
	Ile Pro Gly Ala His Ser Ile Pro Ser Gly His Val Tyr Ser Leu Ser	
	185 190 195 200	

232
235

	gaa cct gaa atg gca gct ctt cga gat ttt gtg gca aga aat gta aaa	1217
	Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn Val Lys	
	205 210 215	
5	gat ggg cta att act cca aog att gca cct aat gga gcc caa gtt ctc	1265
	Asp Gly Leu Ile Thr Pro Thr Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu	
	220 225 230	
10	cag gtg aag aog ggg tgg aaa ctg caa gtt tct tat gat gcc gag tcc	1313
	Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu Gln Val Ser Tyr Asp Ala Glu Ser	
	235 240 245	
15	aac aat ttt act atc cag aat cag tat cct cgc cta tct att cca aat	1361
	Asn Asn Phe Thr Ile Gln Asn Gln Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn	
	250 255 260	
20	tta caa cac caa gca cac ctg gca aog tac act gaa ttc gta cct caa	1409
	Leu Glu Asp Gln Ala His Leu Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val Pro Gln	
	265 270 275 280	
	ata cct gga tac caa aca tac ccc aca tat gcc gog tgc cag acc tac	1457
	Ile Pro Gly Tyr Gln Thr Tyr Pro Thr Tyr Ala Ala Cys Pro Thr Tyr	
	285 290 295	
25	cca gta gga ttc gcc tgg tac cca gtg gga cga cac gga caa gga aga	1505
	Pro Val Gly Phe Ala Trp Tyr Pro Val Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg	
	300 305 310	
30	tca cta tat gta cct gtg atg atc act tgg aat cca cac tgg tac cgc	1553
	Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg	
	315 320 325	
35	cag cct cgg gta cca cag tac cgg cgg cca cag cgg cgg cct cca cca	1601
	Gln Pro Pro Val Pro Gln Tyr Pro Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro	
	330 335 340	
40	cca cca cgg cgg cgg cct cca tct tac agt acc ctg taa atacctgtca	1650
	Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Tyr Ser Thr Leu	
	345 350 355	
	tgtccctcag gatctctgcc ctcaaaattt attcctgttc agcttctcaa tcagtgaactg	1710
	tgtgctaaat tttaggctac tgtatcttca ggcacactga ggcacatcct ctctgaaaog	1770
45	gctatogaag gttagggcca ctctggactg gcacacatcc taaagcacca aaagaccttc	1830
	aacattttct gagagcaaca gactatttgc caataaatga tctctcattt ttccaccttg	1890
50	actgccaatc taactaaaat aattaataag ttacttttcc agccagtccct ggaagcttgg	1950
	gttttracctg ccaaaacctc catcaccatc taaattatag gctgccaat ttgctgttta	2010
	acattttacag agaagctgat acaaacgcag gaaatgctga tttctttatg gagggggaga	2070

238!
236

- 42 -

ogaggaggag gaggacatga cttttcttgc ggtttogga cctctctttt aaatcactgg 2130
5 aggactgagg ccttattaag gaagccaaaa ttatoggtgc agtgtggaaa ggcttcogtg 2190
atcctctcgc tgcacctta gaaacttcac cgtctcaaa cctcatctcc atgggtctgt 2250
taattctcaa ggagcagcaa ctogactggc tctcccagga gcaggaaaaa cctttgtgac 2310
10 atgaaacatc tcaggcctga aaagaaagtg ctctctcaga tggactcttg catgttaaga 2370
ctatgtcttc acatcatggc gcaaatcaca tgtaccaat gactcoggt ctgacacwac 2430
accttaccat catcatgcca tcatggcttc cacaaagcat taaacctggc aaccagagat 2490
15 tactggcggc tccagogtg ttagatgttc atgaaatgtg accacctctc aatcaccttt 2550
gagggctaaa gagtagcaca tcaaaaggac tccaaaatcc catacccaac tcttaagaga 2610
20 tttgtcctgg tacttcagaa agaattttca tgagtgtctt taattggctg gaaaagcacc 2670
agctgaogtt ttggaagaat ctatccatgt gtctgcctcc acatgcatct gggcatttca 2730
tcttcagtcc cctcattaga ctgtagcatt aggatgtgtg gagagaggag aaatcattta 2790
25 gcaccagat tcacactcct atgcctggaa gggggacatc tttgaagaag aggaattagg 2850
gctgtggaca ctgtcttgag gatgtggact tcttagtga gctccacatt acttgatggc 2910
30 aaccacttca aaaggatcag aatccaogta atgaaaaagg tccctctaga ggatggagct 2970
gatgtgaagc tccaatgga tgaaaagcct cagaaagcaa ctcaaaggac tcaaagcaac 3030
ggacaacaca agagtgtct tcagcccagt gacacctctg atgtccctg gaagctttgt 3090
35 gctaacctgg gactgctga ctctcttag cctggctcct tgctactacc ttgaactgtt 3150
ttatctaacc tctcttttc tgtttaattc tttgtactg ccattgaccc tgctgcagga 3210
40 tttgtgtcat tttcctgcct ggtgtgtgag actccatttt gctgccacac acagagatgt 3270
aagaggcagg ctttaattgc caaagcacag tttgagcagt agaaaacaac atgggtgtata 3330
tctcaaattg cctgacatga agaggagtct aacggtgaag tttcactttt catcagcatc 3390
45 atctttcaca tgttcattat catcogctct tattcttgca tgtttaaaca cttaaaattt 3450
ttagtataat ttttagtgtg tttgaaagt gtgactaggc tttcaaaaac ttcattgaa 3510
50 ttacaaagca ctatccagtt cttattgtta aactaagtaa aaatgataag taacatagtg 3570
taaaatattc ctttactgtg aactctctac aatgctgtga atgagaggct cctcagaact 3630

239
237

ggagcatttg tataataatt catcctgttc atcttcaatt ttaacatcat atataatttc 3690
aattctatca attgggcttc taaaaatcat ataaaaggat ataaaatttg aaaacagaaa 3750
5 cctaactggc tatttaatcc aaaacaactt ttttttcc tcaatggat cagaagctt 3810
gtcaaccact catgtgtttt agagtaatta cttttaaaat ggtgcatttg tgcttctgaa 3870
ctattttgaa ggtcacttc tcttacctc aagtatcaat tcatctcca tacatttgaa 3930
10 ttcaagctgt tttttgtcaa atttacagtt gtcaattgat cttcaagctg caggctgcct 3990
agaaatgggc cgttgtctgt agccctggca tgtgcacacg gacatttgcc accactgcaa 4050
15 gcaaaagtct ggagaagttc accaagaca agaagatta gggaaaatc gctgctgtgg 4110
gttaacaact cagaagctcc ctgacacaca tttgctgtt tactaaagct tgtgattaac 4170
tttttggcag tgtgtactat gctctattgc tatatctgc atctataaat gttagtgta 4230
20 aggataagta attctaaatt tattattcta tagctttgaa gtttggtraa gtttctttc 4290
actcaattga tttattttgt tgttaatcaa atttatgtta attggatcct ttaattttt 4350
25 tttggcattt tccaacaaaa atggctttat tcaatagaaa gcaaaaaaat caatggaatt 4410
tgatarctaa agaagctaga aaggagcaa aataaaaaac ataaaggaga tagatgaatt 4470
agtaagcaaa tcagtagtog agtttttcaa actggcaaaa ttaattaatt gacttttagc 4530
30 ccaaatttac attgttaatt aaatcaagaa ggaagaagat ctaagagctc ccattgatag 4590
gcaagcctag agagaactag ctaaatttat catgctagga tattgaaaca cagaagttt 4650
35 acatacattt atgaaggctc aatttagttt ggacagttag gtatttgtct tagtggaaaa 4710
aaggagaatt agtctgatca aatogtgaag taatacagtg aacttgacg tgcacaaaat 4770
aagagggcca catctatatg gtgcagtctg gaattctgtt taagtttgta ggtacctctt 4830
40 ggactttctga attgatccag ttgtcatcca ccacagacat ctacatcag atacagacag 4890
ttccaagatt gacaacagag aacaacctgc tggaaagacc tgggcagaaa tggagagccc 4950
45 tgggggaacc atgtacatt ttcattctaa gagagaatgc acatctgatg agactgaaag 5010
ttctttgttg ttttagattg tagaatgga ttgaattggt ctgtggaaaa ttgcattgct 5070
tttattttct tgtgtaatca agtttaagta ataggggata tataatcata agcatttttag 5130
50 ggtgggaggg actattaagt aattttaagt ggtgggggtt atttagaatg ttagaataat 5190
attatgtatt agatctgct ataagtggac atgctactt acctgtaacc cttacccta 5250

taattgctat ccttaaagat ttcaataaaa ctggagggg acgcagggg gaccaactta 5310
 tttagagoga attggacatg gataaaaacc ccagtgagg aaagttcaaa ggtgattaga 5370
 5 ttaataatit aatagaggat gagtgaactc tgataaatta ctgctagaat gaacttgtca 5430
 atgatggatg gtaaatititc atggaagtta taaaagtgat aaataaaaac ccttgctitit 5490
 10 accctgtca gtagccctcc tctaccact gaaccocatt gccctaccc ctccctctaa 5550
 ctttattgct gtattctctt cactctatat ttctctctat ttgctaarat tgcattgctg 5610
 ttacaataaa aattcaataa agatttagtg gttgaagtga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5670
 15 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 5714

<210> 2
 <211> 356
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

25 Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu Phe Val Arg Ala
 1 5 10 15
 Met Ile Asp Ser Gly Ala Ser Gly Asn Phe Ile Asp His Glu Tyr Val
 20 25 30
 30 Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu Arg Ile Lys Asp Trp Pro Ile Leu Val
 35 40 45
 Glu Ala Ile Asp Gly Arg Pro Ile Ala Ser Gly Pro Val Val His Glu
 35 50 55 60
 Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser
 65 70 75 80
 40 Phe Asp Val Thr Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu Gly Pro Arg
 85 90 95
 Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn Ile Thr Trp Ser Thr Arg Ser Ile
 100 105 110
 45 Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg His His Cys Arg Met Tyr Ser Pro
 115 120 125
 Ile Pro Pro Ser Leu Pro Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Leu Tyr Tyr
 50 130 135 140
 Pro Val Asp Gly Tyr Arg Val Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr Val
 145 150 155 160

241
239

	Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val Asp Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg	
	165	170 175
5	Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met Ile Pro Gly Ala His Ser Ile Pro	
	180	185 190
	Ser Gly His Val Tyr Ser Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg	
	195	200 205
10	Asp Phe Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu Ile Thr Pro Thr Ile	
	210	215 220
	Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu	
15	225	230 235 240
	Gln Val Ser Tyr Asp Ala Glu Ser Asn Asn Phe Thr Ile Gln Asn Gln	
	245	250 255
20	Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu Glu Asp Gln Ala His Leu Ala	
	260	265 270
	Thr Tyr Thr Glu Phe Val Pro Gln Ile Pro Gly Tyr Gln Thr Tyr Pro	
	275	280 285
25	Thr Tyr Ala Ala Cys Pro Thr Tyr Pro Val Gly Phe Ala Trp Tyr Pro	
	290	295 300
	Val Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile	
30	305	310 315 320
	Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Val Pro Gln Tyr Pro	
	325	330 335
35	Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser	
	340	345 350
	Tyr Ser Thr Leu	
	355	
40		

242
240

<210> 3
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (31)
10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 3
15 ctagcccacc atggcatctg cagccacgtg a 31

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (30)
25
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 4
30 agcttcacgt ggctgcagat gccatggtgg 30

<210> 5
<211> 30
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
40 <222> (1) .. (30)

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 5
45 ctagcccacc atggcatctg cagcacgtga 30

50

242
241

- 47 -

<210> 6
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (29)
10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 6
agcttcacgt ggtgcagatg ccatggtgg 29
15

<210> 7
<211> 29
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (29)
25
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 7
30 ctagccacc atggcatctg cacacgtga 29

<210> 8
<211> 28
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
40 <222> (1) .. (28)

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 8
45 agcttcacgt gtgcagatgc catggtgg 28

7A3
242

<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (23)
10
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 9
gggcggtagg cgtgtacggt ggg 23
15

<210> 10
<211> 26
<212> ADN
20
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (26)
25
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 10
30 gcaactagaa ggcacagtcg aggctg 26

<210> 11
<211> 27
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
40
<222> (1) .. (27)

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 11
45 gtttggacag tgaggtattt gtcttag 27

<210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> Unión de cebador
 <222> (1) .. (27)
 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 12
 cttccagca ggtgtctc tgtgtc 27
 15
 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> Unión de cebador
 <222> (1) .. (30)
 25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 13
 30 tgacggggtc acccacactg tgcccatcta 30
 <210> 14
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> Unión de cebador
 40 <222> (1) .. (29)
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 45 <400> 14
 ctagaagcat tgcggtggac gatggaggg 29

245.
244

<210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (22)
10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 15
aaggtgaagg tcggagtcaa cg 22
15

<210> 16
<211> 24
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (24)
25
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 16
30 ggcagagatg atgaccttt tggc 24

<210> 17
<211> 26
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
40 <222> (1) .. (26)

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 17
45 tattttgctc cctttctaac ttcttt 26

246
245

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (30)
10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 18
tttcactttt catcagcatc atctttcaca 30
15
<210> 19
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20
<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (27)
25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 19
cgtagactc ctcttcagtg caggcaa 27
30
<210> 20
<211> 22
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (22)
40
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 20
45 ggtgacacta tagaaggtag gc 22

247
246

<210> 21
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (28)
10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 21
caggcctgag atgtttcatg tcacaagg 28
15

<210> 22
<211> 29
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (29)
25
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 22
30 gcatttcctg cgtttgtatc agctttctt 29

<210> 23
<211> 30
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
40 <222> (1) .. (30)

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 23
45 accagcacca caaccgccac tctattatcc 30

248
249

<210> 24
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (30)
10
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 24
catatagtga tcttccttgc ccgtctcgtc 30
15

<210> 25
<211> 26
<212> ADN
20
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Unión de cebador
<222> (1) .. (26)
25
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 25
30 ggcgccatca attgcttcca caagta 26

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
35
<213> Secuencia artificial

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

<400> 27
40 gcagagctcg tttagtgaac c 21

249
248

- 54 -

<210> 27
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 27
Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly Arg
1 5
10
<210> 28
<211> 9
15 <212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
<400> 28
Ile His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu
20 1 5
<210> 29
25 <211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
30 <400> 29
His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu Phe
1 5
35
<210> 30
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
40
<400> 30
Tyr Val Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu
1 5
45
<210> 31
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
50
<400> 31
Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu
1 5
55

250
249

- 55 -

<210> 32
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 32
Ile Leu Val Glu Ala Ile Asp Gly Arg
1 5
10
<210> 33
<211> 9
<212> PROTEÍNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 33
Gly Arg Pro Ile Ala Ser Gly Pro Val
20 1 5
<210> 34
<211> 9
<212> PROTEÍNA
25 <213> Homo sapiens
<400> 34
Glu Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu
30 1 5
<210> 35
<211> 9
<212> PROTEÍNA
35 <213> Homo sapiens
<400> 35
Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu
40 1 5
<210> 36
<211> 9
<212> PROTEÍNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 36
Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser Phe
50 1 5

251
250

- 56 -

<210> 37
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 37
Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu
1 5
10
<210> 38
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
15
<400> 38
Val Leu Gly Pro Arg Trp Leu Ser Ala
1 5
20
<210> 39
<211> 9
<212> PROTEÍNA
25 <213> Homo sapiens
<400> 39
Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn Ile
30 1 5
<210> 40
<211> 9
<212> PROTEÍNA
35 <213> Homo sapiens
<400> 40
Arg Ser Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr
40 1 5
<210> 41
<211> 9
<212> PROTEÍNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 41
Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg
50 1 5

252
251

- 57 -

<210> 42
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 42
Pro Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Leu
1 5
10
<210> 43
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
15
<400> 43
Pro Leu Tyr Tyr Pro Val Asp Gly Tyr
1 5
20
<210> 44
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
25
<400> 44
Arg Val Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr
1 5
30
<210> 45
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
35
<400> 45
Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr Val
1 5
40
<210> 46
<211> 9
<212> PROTEÍNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 46
Val Arg Tyr Tyr Tyr Val Gln Asn Val
50 1 5

253
252

- 58 -

<210> 47
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 47
Tyr Val Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val
1 5
10
<210> 48
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
15
<400> 48
Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg Leu
1 5
20
<210> 49
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
25
<400> 49
Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met Ile
1 5
30
<210> 50
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
35
<400> 50
Glu Met Ile Pro Gly Ala His Ser Ile
1 5
40
<210> 51
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
45
<400> 51
His Ser Ile Pro Ser Gly His Val Tyr
1 5
50

254
253

- 59 -

5
<210> 52
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
<400> 52
Ile Pro Ser Gly His Val Tyr Ser Leu
1 5
10
<210> 53
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
15
<400> 53
Ser Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala
1 5
20
<210> 54
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
25
<400> 54
Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu
1 5
30
<210> 55
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
35
<400> 55
Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe
1 5
40
<210> 56
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
45
<400> 56
Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe Val
1 5
50

255
254

- 60 -

<210> 57
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 57
Ala Leu Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn
1 5
10
<210> 58
<211> 9
<212> PROTEÍNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 58
Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu
20 1 5
<210> 59
<211> 9
<212> PROTEÍNA
25 <213> Homo sapiens
<400> 59
Thr Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val
30 1 5
<210> 60
<211> 9
<212> PROTEÍNA
35 <213> Homo sapiens
<400> 60
Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu
40 1 5
<210> 61
<211> 9
<212> PROTEÍNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 61
Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys
50 1 5

254.
255

- 60 -

<210> 57
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 57
Ala Leu Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn
1 5
10
<210> 58
<211> 9
<212> PROTEÍNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 58
Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu
20 1 5
<210> 59
<211> 9
<212> PROTEÍNA
25 <213> Homo sapiens
<400> 59
Thr Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val
30 1 5
<210> 60
<211> 9
<212> PROTEÍNA
35 <213> Homo sapiens
<400> 60
Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu
40 1 5
<210> 61
<211> 9
<212> PROTEÍNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 61
Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys
50 1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 62
Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu
1 5
10
<210> 63
<211> 9
<212> PROTEÍNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 63
Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu
20 1 5
<210> 64
<211> 9
<212> PROTEÍNA
25 <213> Homo sapiens
<400> 64
Glu Asp Gln Ala His Leu Ala Thr Tyr
30 1 5
<210> 65
<211> 9
<212> PROTEÍNA
35 <213> Homo sapiens
<400> 65
His Leu Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val
40 1 5
<210> 66
<211> 9
<212> PROTEÍNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 66
Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu
50 1 5

258-1
257

- 62 -

<210> 67
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 67
Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr
1 5
10
<210> 68
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens
15
<400> 68
Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val
1 5
20
<210> 69
<211> 9
<212> PROTEÍNA
25 <213> Homo sapiens
<400> 69
Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile Thr
30 1 5
<210> 70
<211> 9
<212> PROTEÍNA
35 <213> Homo sapiens
<400> 70
Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg
40 1 5

1-50
258

Reivindicaciones de patente

1. Antígeno asociado con tumores con la denominación R11, caracterizado porque presenta la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 2 o
5 contiene a ésta como secuencia parcial.
2. Fragmento de proteína o péptido inmunógeno, caracterizado porque se deriva del antígeno asociado con un tumor, que se define en la reivindicación 1..
- 10 3. (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación 2, que provoca una respuesta inmunitaria humoral.
4. (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación 2, el cual, o cuyos productos de degradación, son presentados por moléculas de MHC y provocan una
15 respuesta inmunitaria celular.
5. Péptido inmunógeno según la reivindicación 4, seleccionado entre el grupo de péptidos conformes a SEQ ID NO: 27 hasta 70.
- 20 6. (Poli)péptido inmunógeno según una de las reivindicaciones 1 a 5, para la inmunoterapia de enfermedades de cáncer *in vivo* o *ex vivo*, induciendo el (poli)péptido una respuesta inmunitaria contra células de tumores del paciente, que expresan R11.
- 25 7. Composición farmacéutica para la administración por vía parenteral, tópica, oral o local, caracterizada porque contiene como componente activo uno o varios (poli)péptidos inmunógenos según una de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, caracterizada porque
30 contiene diferentes péptidos inmunógenos derivados de R11.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, caracterizada porque contiene uno o varios péptidos derivados de R11 en mezcla con otros péptidos derivados de antígenos asociados con tumores.

259

10. Composición farmacéutica según la reivindicación 7 u 8, caracterizada porque los péptidos se fijan a por lo menos dos diferentes tipos de HLA.
- 5 11. Molécula aislada de ADN, que codifica una proteína con las propiedades inmunógenas del antígeno asociado con tumores, definido en la reivindicación 1, o fragmentos de éste.
- 10 12. Molécula de ADN según la reivindicación 11, que codifica un polipéptido inmunógeno con la denominación R11, que presenta la secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 2 o que contiene a ésta, o que codifica fragmentos de proteínas o péptidos derivados de ellos.
- 15 13. Molécula de ADN según la reivindicación 12, caracterizada porque es un polinucleótido con la secuencia representada en SEQ ID NO: 1 o contiene esta secuencia o porque es un polinucleótido o contiene a éste, que se hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 1.
- 20 14. Molécula de ADN recombinante, que contiene una molécula de ADN según una de las reivindicaciones 12 a 13.
- 25 15. Molécula de ADN según una de las reivindicaciones 11 a 14, para la inmunoterapia de enfermedades de cancer, induciendo el poli(péptido) de R11 expresado por la molécula de ADN una respuesta inmunitaria contra células tumorales del paciente, que expresan R11.
- 30 16. Utilización de células, que expresan el antígeno definido en la reivindicación 1, para la preparación de una vacuna contra el cáncer.
17. Anticuerpo contra un (poli)péptido definido en una de las reivindicaciones 1 a 5.
18. Anticuerpo según la reivindicación 17, caracterizado porque es monoclonal.

260
260

- 65 -

19. Anticuerpo según la reivindicación 17 ó 18, para la terapia y el diagnóstico de enfermedades de cáncer, que están asociadas con la expresión de R11.

262
261

- 66 -

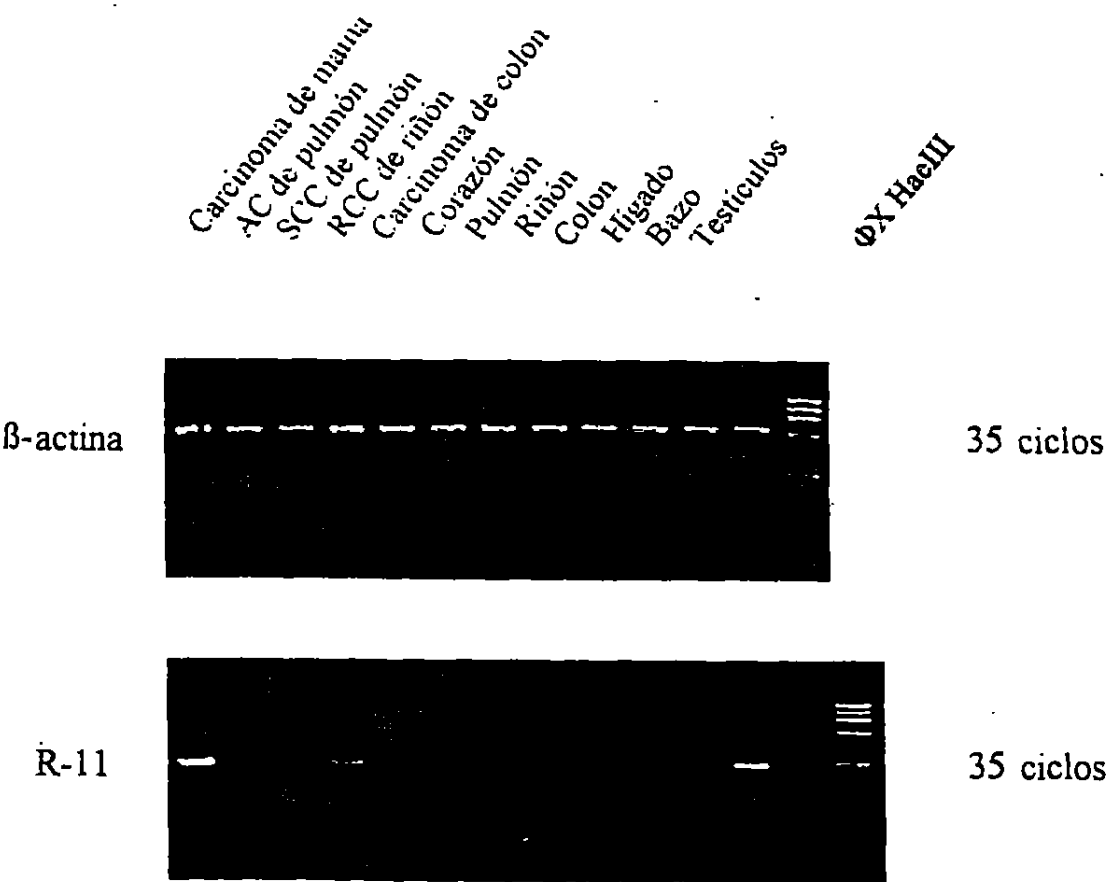
RESUMEN

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

5

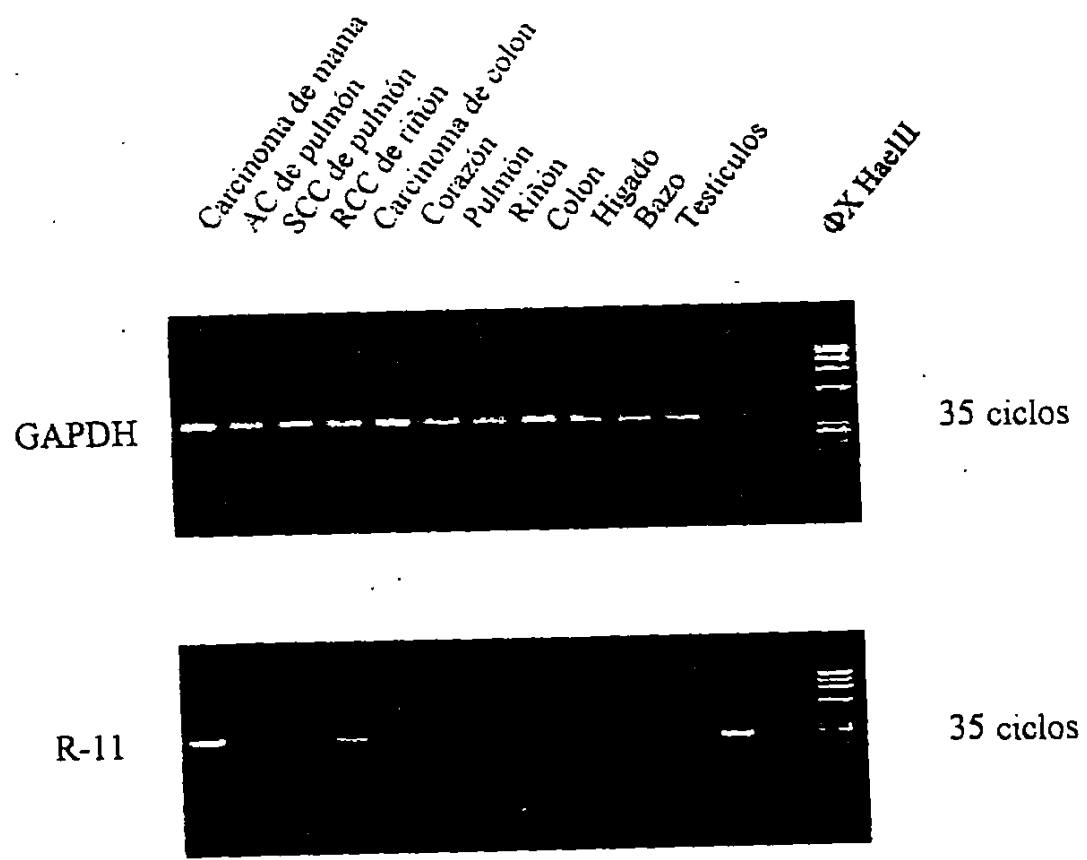
262

Fig. 1A



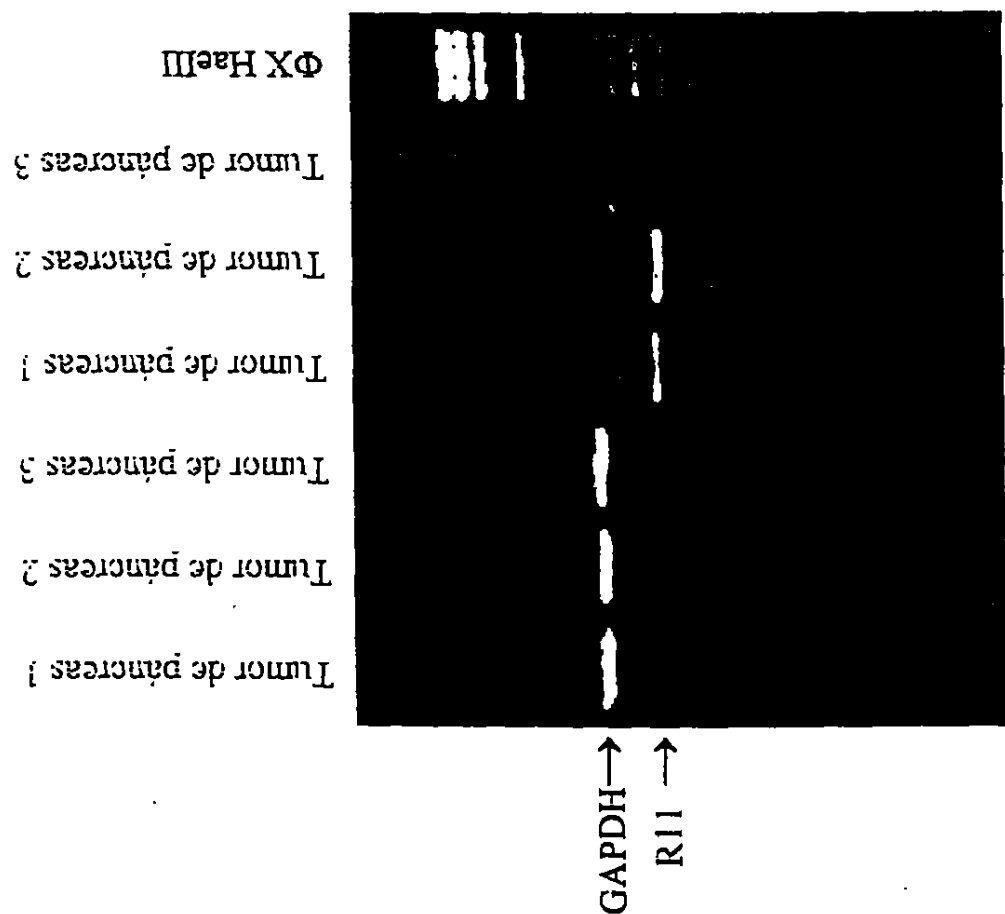
263

Fig. 1B



265
264

Fig. 2



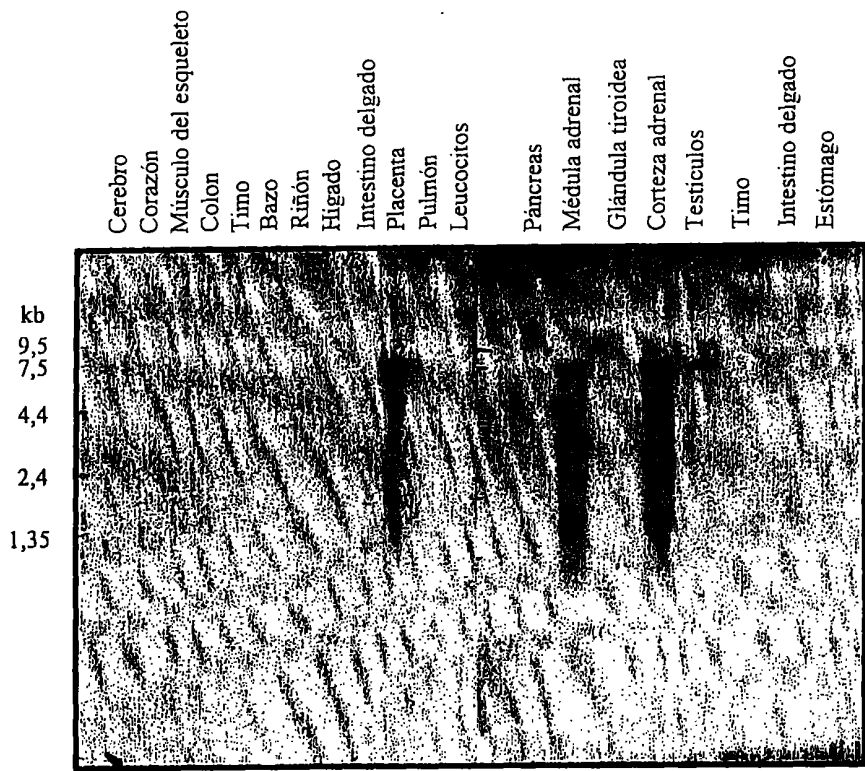
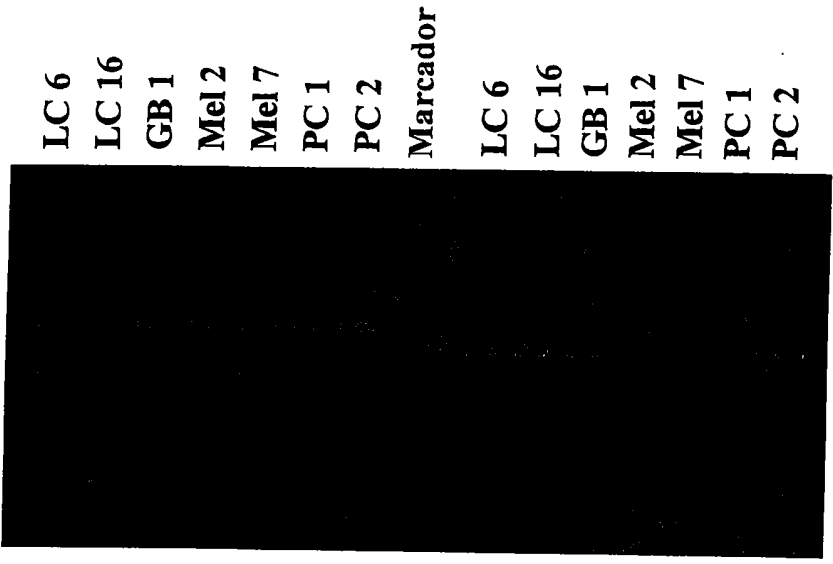


Fig. 3

21
265



(35 ciclos)

Fig. 4

Fig. 4

267

promotor de CMV AAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTA sitio de poli (A) de BGH

Nhe I *Hind* III

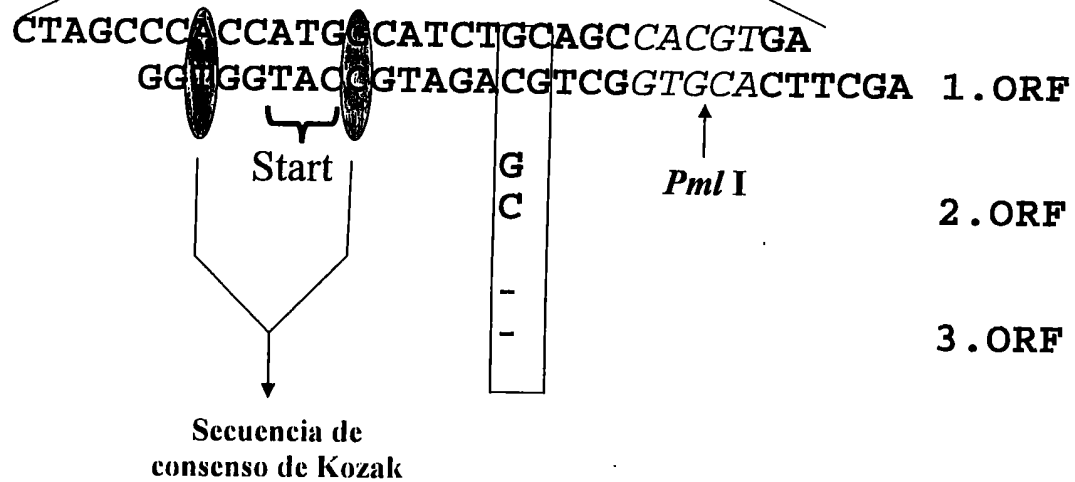


Fig. 5

488