



SITUDD
NTE D
NCION

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Sindicacion : 0058185 01mmms
Fecha (A/D): 2020-08-02 17:25:59
Tramite : 022 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E: 02 EVENTO:01 ACTUACION: 411

Folios: 101

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GmbH**

No. de identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Alemania

Departamento o Estado

Dirección

Ciudad

D-55216 Ingelheim am Rhein

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio

Carrera 4 no. 72-35 piso 4o.,

Ciudad

BOGOTA COLOMBIA

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

- 1- Renate KONOPITZKY
- 2- Ulrich KOENIG
- 3- Wolfgang SOMMERGRUBER
- 4- Thomas WOELFEL

Identificación

- 1- A-2540 Bad Voeslau, Waldwiese 6/11, Austria
- 2- A-1180 Vienna, Martinstrasse 90/2/9, Austria
- 3- A-3002 Purkersdorf, Linzerstrasse 19/Haus 4, Austria.
- 4- D-55129, Lion-Feuchtwangerstrasse 15, Alemania.

Dirección

Ciudad

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

ANTÍGENO ASOCIADO CON TUMORES (R11)

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País

Fecha

No. Solicitud

DE.

04 de agosto de 1999

199 36 563.6

Convención de París.

Para Publicar a los ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo: 09255.801-023-4

RC/Mm-137

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

: C07K 001/000

-2 AGO. 2000

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención describe antígenos asociados con tumores, péptidos inmunógenos derivados de ellos y moléculas de ADN que codifican a éstos, así como su utilización en la inmunoterapia de enfermedades de cáncer.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|--|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☒ |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC | ☒ |
| Recibo de la tasa respectiva <i>por v. l. de \$608.000.-</i> | ☒ |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Andina: | |
| Copia de la primera solicitud | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Unionista: | |
| Copia certificada de la primera solicitud: | ☐ |
| Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior | |
| Traducción simple | ☐ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios <i>(6 págs.)</i> | ☒ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietarios según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☒ |
| Extracto para publicación según formato | ☒ |
| Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms | ☐ |
| Otros Documentos | ☐ |

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA



NOMBRE EMILIO FERRERO

CC. 438.019 de Usaquén

T.P.No. 31.929

Antígeno asociado con tumores (R11)

El invento se refiere a la inmunoterapia de enfermedades tumorales.

El sistema inmunitario tiene la misión de proteger al organismo con respecto
5 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
10 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,
15 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
20 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
25 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
30 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 mononuclea-

res 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
5 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
10 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
15 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).

20 Las células T reconocen a los antígenos como fragmentos de péptidos, que
son presentados a superficies celulares de moléculas de MHC (de "*Major Histocom-*
patibility 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
25 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 en las denominadas "células
presentadoras de antígenos (APC de *Antigen Presenting Cells*) profesionales" y
30 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
efectores, 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).

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

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
10 establecimiento de bancos de ADNc por sustracción (RDA, de "*representational difference analysis*" = análisis por diferencia representativa; Hubank y Schatz, 1994; 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,
15 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 (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
20 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 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
25 asociado con tumores (TAA).

El problema planteado por esta misión se resolvió produciendo en primer lugar mediante RDA ("*representational difference analysis*") entre una línea celular derivada de un paciente con carcinoma de páncreas y un conjunto (*poo*) de 11 tejidos normales diferentes de una biblioteca por sustracción de ADNc. Para la generación
30 de los fragmentos de ADNc de "*tester*" (ensayadores) y "*driver*" (impulsores) necesarios para la hibridación substractiva, se empleó, a diferencia del protocolo 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. EcoRV: 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 homogénea 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
5 variantes por empalme o genes homólogos.

El ADNc de R11 humano fue clonado a partir de un testículo, la secuencia 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
10 presente invento contiene dos cuadros de lectura abiertos (ORF de *Open Reading Frame*) separados unos de otros respectivamente para una proteína con una longitud de 401 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) y para una proteína con una longitud de 357 aminoácidos (SEQ ID NO: 3). El ADNc de R11 clonado en el transcurso del presente invento presenta una longitud de 6.582 pb, realizándose que la presencia de una cola
15 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 puede excluir que en 5' del ADNc secuenciado se presente otro ATG, que constituya el ATG de iniciación para el primer cuadro de lectura abierto (R11-ORF-1); en este
20 caso, el ADNc existente en el extremo 5' contiene la región que codifica el segmento terminal de C de R11-ORF-1. Informaciones acerca del extremo 5' y de un segmento de secuencia codificadora que está situado eventualmente más arriba de la secuencia, se pueden obtener por métodos clásicos de biología molecular, p.ej. mediante una 5'-RACE ("*rapid amplification of cDNA ends*" = amplificación rápida
25 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 adaptador (que se fija específicamente al adaptador en el
30 extremo 5' del ADNc) y con un cebador específico para R11 (p.ej. SEQ ID NO: 26) permite la amplificación de correspondientes fragmentos de R11. Estos productos de PCR, como se describen en el Ejemplo 6, pueden ser clonados de acuerdo con métodos clásicos y ser caracterizados, especialmente por secuenciación del ADN.

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
5 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 arriba desde el extremo 5' del ADNc obtenido, p.ej. la región de promotor de R11.

10 En el transcurso de la clonación completa del ADNc de R11 se puede comprobar si el cuadro de lectura abierto de R11-ORF-1, 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.

El ADNc aislado dentro del marco del presente invento tiene la secuencia de
15 nucleótidos que se indica en SEQ ID NO: 1; ha de suponerse (compárese arriba) que éste codifica el segmento terminal de C de un antígeno asociado con tumores (TAA) con la denominación R11-ORF-1 y codifica una proteína adicional, que es representada por el segundo cuadro de lectura (R11-ORF-2).

Las dos proteínas, expresadas por el ADNc aislado, de ambos cuadros de
20 lectura, tienen las secuencias de aminoácidos que se representan en las SEQ ID NO: 2 y 3 respectivamente.

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

25 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 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
30 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 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 las denominaciones R11-ORF-1 y R11-ORF-2, teniendo R11-ORF-2 la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 3 y teniendo R11-ORF-2 la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 o conteniendo a ésta; o bien para fragmentos de proteínas o para péptidos que se derivan de R11-ORF-1 o de R11-ORF-2. 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.

En un aspecto adicional, el presente invento se refiere a los antígenos asociados con tumores que llevan las denominaciones R11-ORF-1 y R11-ORF-2, verificándose que para el caso de R11-ORF-1 que en dirección 5' se presenta una prolongación del existente cuadro de lectura abierto, que constituye una secuencia parcial para la secuencia de aminoácidos indicada para R11-ORF-1 en SEQ ID NO: 2. En el caso de las proteínas con las secuencias indicadas en SEQ ID NO: 2 y 3 respectivamente se trata de productos, que son traducidos por un transcrito con un tamaño de aproximadamente 7,5 kb, o que son 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 la cápsulas suprarrenales o se derivan de transcritos de los genes homólogos con ellos.

Las secuencias de aminoácidos representadas en SEQ ID NO: 2 ó 3 pueden presentar desviaciones, p.ej. las que son debidas a un intercambio de aminoácidos, siempre y cuando que los derivados de R11 (en lo sucesivo "R11", cuando no se indica otra cosa distinta, se refiere a R11-ORF-1 y/o R11-ORF-2) que tiene las propiedades inmunógenas deseadas para la utilización en una vacuna contra tumores.

La secuencia natural de aminoácidos de R11-ORF-1 o respectivamente R11-ORF-2 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 para 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 epítopos 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-ORF-1 ó R11-ORF-2. 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

5 R11-ORF-1 ó R11-ORF-2 (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).

10 Se incluyen conjuntamente también todos los péptidos que se derivan de la región en el 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

15 inmunológica entre tumores y tejidos normales (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-ORF-1 ó R11-ORF-2 específicas para tumores, convenientemente con ayuda de sondas procedentes del ADNc conforme al invento, aislado a partir de testículos, se clona el ADNc de

20 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

25 presente invento concierne por consiguiente, en un aspecto adicional, a péptidos de R11 que se derivan de regiones de un R11-ORF-1 o R11-ORF-2 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

30 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

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
5 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,
10 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 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
15 oriente hacia las células de tumores del paciente, en el caso de la utilización de un 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.

20 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 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
25 conocidos antígenos de proteínas p.ej. el método descrito por Stauss y colaboradores, 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 presentada por ésta,
30 fueron recopilados como el 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. Este 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 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 de 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 epítomos 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 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

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).

Desde hace poco tiempo están disponibles bancos de datos y algoritmos de predicción, que permiten con gran confiabilidad la predicción de epítopos 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, 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 epítopos para CTL's inmunógenos; los péptidos determinados se enumeran en la Tabla 1. De una manera similar, 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 epítopos para péptidos; esto es válido también para epítopos para péptidos de otros tipos de HLA's.

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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

Los polipéptidos 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.

Los dos TAA's con las denominaciones R11-ORF-1 y R11-ORF-2 de acuerdo con el presente invento, y los fragmentos de proteínas, péptidos o equivalentes a péptidos o miméticos de péptidos, que se derivan de ellos, se pueden emplear en la terapia del cáncer, p.ej. 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-ORF-1 y/o para R11-ORF-2, 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 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 los TAA's R11-ORF-1 y/o R11-ORF-2 o

fragmentos o péptido(s) derivados de ellos, teniendo la cantidad de TAA's (péptido) que ser suficiente a fin de conseguir una respuesta eficaz de CTL's al tumor que lleva los antígenos.

El invento concierne por consiguiente en un aspecto adicional a una
5 composición farmacéutica para la administración por vía parenteral, tópica, oral o local. Preferiblemente, sirve la composición para la administración por vía parenteral, p.ej. para la aplicación subcutánea, intradérmica o intramuscular, que como componentes activos contiene los TAA's R11-ORF-1 y/o R11-ORF-2 o fragmentos o péptido(s) derivados de ellos. Los TAA's/péptidos de R11 están disueltos o
10 suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. La composición puede contener, además de ello, sustancias coadyuvantes usuales, tales como tampones, etc. Los TAA's/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 realización, policationes tales como
15 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 se adecuan para la preparación y la
20 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 polipéptidos de R11, o los péptidos de R11, se pueden utilizar también para provocar una respuesta *ex vivo* de CTL's. Una respuesta *ex vivo*
25 de CTL's a un tumor 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
30 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

- 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 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.
- 10 Los péptidos conformes al invento se pueden emplear también como reactivos 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.
- 15 Por ejemplo, dependiendo de la forma de presentación del TAA (péptido, proteína 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
- 20 utilizar para caracterizar la evolución patológica de un tumor positivo para R11-ORF-1 ó R11-ORF-2 (p.ej. 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
- 25 como marcador relevante en el pronóstico y en la evolución terapéutica en el caso del cáncer de mama (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
- 30 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).

Por las moléculas de ADN conformes al invento, antes definidas, están abarcadas conjuntamente también las que conducen por mutación a un intercambio de aminoácidos en la secuencia de proteína que se representa en SEQ ID NO: 2 ó 3 respectivamente, siempre y cuando que éstas codifiquen un derivado de R11 o fragmentos o péptidos con las propiedades inmunógenas deseadas para la aplicación 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 inmunoterapia 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 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 ("*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 targeting sequence*") se puede elevar el tratamiento y por consiguiente la 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 según la SEQ ID NO: 1 o una secuencia parcial, especialmente la secuencia que codifica el polipéptido R11-ORF-1 ó R11-ORF-2.

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

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 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.

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.

El invento concierne, en otro aspecto adicional, a anticuerpos contra R11-ORF-1 ó R11-ORF-2 (en lo sucesivo denominados "anticuerpos anti-R11") o fragmentos de ellos. Anticuerpos anti-R11 policlonales 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 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-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 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
5 animales transgénicos (Brüggemann y colaboradores, 1996, Jakobovits y colaboradores, 1995).

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
10 específicos para R11-ORF-1 y R11-ORF-2 con el fin de llevar a cualesquiera sustancias deseadas de manera selectiva a o dentro de un tumor, que expresa R11-ORF-1 y/o R11-ORF-2. 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-ORF-1 ó R11-ORF-2, específica para
15 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-ORF-1 y/o R11-ORF-2 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
20 están descritas en el documento WO 95/33771.

Los TAA's con las denominaciones R11-ORF-1 y R11-ORF-2 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
25 cáncer, p.ej. con el fin de inducir una respuesta inmunitaria contra células de tumores, que expresan los correspondientes determinantes de antígenos. Preferiblemente, son utilizados para la terapia de tumores positivos para R11-ORF-1 y/o R11-ORF-2 especialmente en el caso de los carcinomas de mama, células renales y páncreas.

En una aplicación adicional, el R11 se puede emplear como molécula diana
30 ("target") de una quimioterapia dirigida.

Se entiende por quimioterapia la administración terapéutica de sustancias, que por intervención en el metabolismo de células malignas, su transducción de señales y sus procesos de división celular, actúan o bien citostáticamente o citotóxica-citolíticamente.

En principio, estos agentes quimioterapéuticos desarrollan su efecto en todas las células que se dividen; las células de tumores manifiestan sin embargo una sensibilidad frente a estas sustancias que es más alta que la de las células sanas, puesto que principalmente son atacadas las células que se proliferan intensamente.

- 5 Una premisa para la utilización del R11 asociado con tumores como diana para la quimioterapia es - al contrario que los enfoques de terapias inmunológicas antes señalados - el conocimiento de la función que tienen las proteínas de R11 R11-ORF-1 y R11-ORF-2, o el gen que las codifica.

- 10 Como primera etapa en el análisis de funciones denominado "en sentido descendente = *down-stream*" de R11, se lleva a cabo convenientemente un análisis bioinformático que es determinante de la dirección para la validación experimental de R11 como diana para la quimioterapia.

- 15 Para este análisis, los conceptos bioinformáticos que se basan en la similaridad y en la estructura modular, constituyen un fundamento esencial. Medios auxiliares bioinformáticos consagrados para la comprobación de similitudes son el BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Altschul y colaboradores, 1997) o el FASTA (Pearson y Lipman, 1988), los bancos de datos especializados tales como el Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam>, Bateman y colaboradores, 2000) y SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>, Schultz y colaboradores, 2000), que toman en
20 consideración estructuras de dominios. Para el refinamiento del análisis se puede hacer uso de aplicaciones tales como Clustal (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>, Higgins y colaboradores, 1996), HMMer (<http://hmmer.wustl.edu>), PSI-BLAST (Altschul y colaboradores, 1997) y el banco de datos PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>, Hofmann y colaboradores, 1999). Los métodos estadísticos de análisis,
25 que no se basan en homologías, permiten la predicción de otras propiedades relevantes para la estructura y la función tales como la estructura secundaria y la aparición de segmentos transmembranales y motivos de hélice-espira-hélice (*Helix-Turn-Helix*). Están disponibles métodos para la predicción de la estructura secundaria de proteínas; es especialmente digno de mención el *Jpred* (<http://barton.ebi.ac.uk/servers/jpred.html>, Cuff y colaboradores, 1988). La predicción de la estructura
30 secundaria puede respaldar a hipótesis funcionales, por ejemplo cuando se conoce la estructura de los homólogos supuestos.

A continuación de ello, el R11 es sometido a un análisis bioquímico o biológico.

Después de haberse realizado el análisis de secuencias antes descrito, los R11-ORF-1 y R11-ORF-2 se someten a un análisis bioquímico y biológico. La elección de los métodos empleados para los análisis ulteriores se orienta al resultado del análisis bioinformático realizado.

5 Un ejemplo del análisis de las funciones es el análisis de las proteínas teóricamente derivadas del cromosoma III del genoma de la levadura. (En uno de tales análisis se consiguió, mediante empleo de la bioinformática, predecir más de 70% de las funciones de los genes, que ya pudieron ser confirmadas en parte experimentalmente (Bork, P. y colaboradores, 1992; Sharp, P.M. y colaboradores, 1993 y
10 Koonin E.V. y colaboradores, 1994)).

En todos los estudios que se han de realizar es importante realizar una elección previa de los dominios de la proteína con función desconocida que se ha de analizar, que presentan una marcada complejidad estructural, puesto que una escasa información estructural (p.ej. de zonas globulares) no contribuye a ningún contenido
15 esencial de información. Una extensa recopilación acerca de ejemplos de la predicción con éxito de las funciones partiendo de secuencias de proteínas, ha sido publicada en la obra Nature Genetics de Bork y Koonin (Bork y Koonin, 1998).

En el caso del análisis de funciones del R11-ORF-1, realizado dentro del marco del presente invento, se comprobó que según el análisis bioinformático se trata de
20 una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción que contienen dominios de "dedos de zinc".

Mediante apropiados experimentos, tales como p.ej. el "desplazamiento por movilidad = *mobility shift*", South-Western, reticulación por UV, etc., se puede comprobar la detección de una interacción directa y/o indirecta con ácidos nucleicos,
25 especialmente en regiones de promotores. Métodos apropiados para ello son conocidos por la bibliografía (p.ej. Ausubel y colaboradores, 1994).

Para los primeros 280 aminoácidos de la proteína que se deriva de la región de R11-ORF-2 se pudo mostrar una manifiesta homología con una poliproteína pol retrovímica. Por consiguiente, en el caso del R11-ORF-2 se podría tratar de un posible
30 retro-transposón.

Si está firmemente establecida la función del R11-ORF-1 o bien del R11-ORF-2, se analiza la importancia del gen de R11 y de su función o de la función de las proteínas codificada por éste para el suceso tumoral. Esto se puede mostrar p.ej. mediante análisis de proliferación *in vitro* o en modelos con animales mediando

empleo de células de tumores, que sobreexpresan (constitutiva o induciblemente) el gen que se ha de investigar, y que como control (testigo) o bien expresan en forma suprimida (inactiva) o regulan en sentido descendente a través de una secuencia antisentido (véase p.ej. Grosveld y Kollias, 1992).

- 5 El R11 se puede utilizar en los análisis de escrutinio, a fin de identificar sustancias, que modulen, especialmente inhiban, la actividad de R11-ORF-1 ó R11-ORF-2. En una forma de realización, uno de tales análisis puede consistir p.ej. en incorporar el R11-ORF-1 ó R11-ORF-2 o un fragmento activo de éste, en células que reaccionan frente a la actividad de R11 con proliferación o llevar a expresión en la
- 10 célula el correspondiente segmento de ADNc de R11, y determinar la proliferación de las células en presencia y en ausencia de una sustancia de ensayo.

- Un ejemplo de células de ensayo son las células con bajo grado de división, p.ej. células primarias, que no tienen nada de R11 endógeno. Con el fin de comprobar la idoneidad de las células para un análisis de escrutinio, éstas se transforman con
- 15 el ADNc de R11, se cultivan y se ensayan con análisis clásicos, por ejemplo por incorporación de timidina, en cuanto a su capacidad de proliferación. Como consecuencia de un aumento importante de su propiedad de proliferación después de la expresión de R11, éstas se pueden emplear como células de ensayo, p.ej. en análisis de la proliferación para escrutinio con alto rendimiento (*High Throughput*
- 20 *Screening Proliferations Assays*). Ejemplos de análisis de la proliferación en el formato de alto rendimiento (*High Throughput*), p.ej. sobre la base del análisis MTS, se describen en el documento WO 98/00713,

- Los inhibidores de R11 con un efecto inhibidor de la proliferación se pueden utilizar para el tratamiento de tumores con intensa expresión de R11, especialmente
- 25 en los casos de carcinomas de mama, células renales o páncreas.

Vista de conjunto de las figuras:

- Figura 1: Transcripción de R11 en tejidos de tumores y normales;
RT-PCR semicuantitativa
- Figura 2: Transcripción de R11 en tejidos de tumores y tejidos normales:
30 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 células de tumores humanas
- Figura 5: Región modificada del vector pC3.1(+).

Ejemplo 1

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); éste 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 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 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 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).

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 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 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: 4 y 5; vector ORF1) o (SEQ ID NO: 6 y 7; vector ORF2) o (SEQ ID NO: 8 y 9; 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.

- 5 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
- 10 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 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
- 15 cebadores flanqueadores (SEQ ID NO: 10 y 11), 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 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 substracción de ADNc a base de 3.450
- 20 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. De este modo, tal como se esperaba, se pudo comprobar una longitud media de aproximadamente 800 pb de los fragmentos de ADNc insertados.

25 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

- El ADN de plásmido de 50 clones seleccionados arbitrariamente a partir de la biblioteca substractiva de ADNc se aisló correspondientemente a los datos del
- 30 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 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 de datos con una identidad > 95% (BLAST) con respecto a la secuencia determinada experimentalmente se comprobó 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.

10 **Ejemplo 4**

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

Entre 2 y 5 µg 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: 14 y 15) y cebadores específicos para GAPDH (SEQ ID NO: 16 y 17) 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: 12 y 13) 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: 12 y 13) 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:

12 y 13), 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.

10 Ejemplo 5

Perfil de transcripción de R11 en tejidos normales

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 [α -³²P]dCTP (NEN, Boston), a 68°C durante 2 h. La visualización se efectuó mediante autorradiografía clásica (Hyperfilm, Amersham). 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 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 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).

30 Ejemplo 6

Clonación del ADNc de R11

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 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: 18 y 19) 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: 20) y un cebador específico para el vector (SEQ ID NO: 21) otros fragmentos pertenecientes a R11 mediando 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: 22 y 23) y con el cebador específico para el vector (SEQ ID NO: 21).

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: 24 y 25). 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: 26 y 27) mediando 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.

Partiendo de estas secuencias identificadas de nuevas, se pudieron clonar a partir de una biblioteca de ADNc de testículos humanos SuperScript® (GibcoBRL), con los siguientes cebadores de oligonucleótidos adicionales específicos para R11 (SEQ ID NO: 28 a 43), regiones de secuencias en 5' situadas secuencia arriba. Los cebadores se combinaron en tal caso con un cebador específico para un plásmido (SEQ ID NO: 21) ya descrito anteriormente o se combinaron entre ellos para la

clonación por PCR mediando utilización del estuche para PCR de ADNc Advantage (Clontech)."

La región clonada del ADNc de R11 es de 6.582 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. Se identificaron dos cuadros de lectura continuos separados uno de otro. El primer cuadro de lectura situado por el lado de 5' (R11-ORF-1; SEQ ID NO: 2), está representado por el codón de iniciación en la posición 218 y el codón de detección (TAG) en la posición 1.421 en SEQ ID NO: 1. 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 una mención acerca de 3 posibles sitios de glicosilación en N (posiciones nº 62-65, 76-79 y 117-120 en SEQ ID NO: 2), un sitio de fosforilación de PKS (proteína-quinasa) dependiente de AMPc y GMPc (posiciones nº 11-14 en SEQ ID NO: 2), otros 7 sitios posibles de fosforilación de PKC (posiciones nº 9-11, 14-16, 78-80, 119-121, 183-185, 202-204 y 210-212 en SEQ ID NO: 2) así como 6 posibles sitios de fosforilación de caseína-quinasa II (posiciones nº 119-122, 127-130, 183-186, 256-259, 295-298 y 358-361 en SEQ ID NO: 2). Debería ser de interés especial para la predicción de una posible función de R11-ORF-1 el motivo de dedo de zinc (zf-CCHC; E=0,11, Pfam-A HMM) desde la posición nº 371 hasta la posición nº 384 en SEQ ID NO: 2 (CLYCGTGGHYADNC). De miembros de la familia de proteínas que presentan estos motivos se sabe que no tienen inserciones ni deleciones en el motivo propiamente dicho; lo cual es pertinente también a la proteína de R11-ORF-1. Aun cuando no se puede encontrar ninguna secuencia típica de fijación a SH3, es perfectamente concebible que la región rica en P (posiciones nº 36-56 en SEQ ID NO: 2) podría interactuar con un dominio de SH3. Mediante empleo del algoritmo COILS se puede predecir con una probabilidad superior al 99% para los residuos de aminoácidos en la región desde las posiciones nº 80 hasta aproximadamente 125 una estructura de hélice enrollada (*coiled-coil*). Por causa de estos dos dominios, el motivo de dedo de zinc y el dominio de hélice enrollada, se puede sacar la conclusión de que en el caso del R11-ORF-1 se trata posiblemente de un factor de transcripción, cuya oligomerización es controlada a través de estos dos dominios.

En el segundo cuadro de lectura abierto, R11-ORF-2, que está definido por un codón de iniciación en la posición nº 1.498 y un codón de detención (TAA) en la

posición nº 2.569, junto con los dos segmentos ricos en prolina manifiestos (posiciones nº 128-141 y 330-351 en SEQ ID NO: 2) se identificaron motivos potenciales para dos sitios de glicosilación en N (104-107 y 251-254), un sitio de fosforilación de proteína-quinasa C (108-110), cinco sitios de fosforilación de caseína-quinasa II (99-102, 165-168, 198-201, 200-203 y 274-277) y una región que tiene similitud con el centro activo de aspartato-proteinasas eucarióticas y víricas (16-27). Es especialmente digna de mención la inequívoca homología de los primeros 280 aminoácidos de R11-ORF-2 con la poliproteína pol retroviral. En el extremo terminal de C, por el contrario, no se pudieron descubrir homologías de ningún tipo. Los aminoácidos desde la posición nº 9 hasta la 277 se alinean en blastp inequívocamente con la poliproteína pol Fugu (posiciones nº 104-365; 2e⁻²²). El modelo de aspartato-proteasa nº 16-27 antes mencionado abarca el nucleófilo activo Asp (nº 19) del centro activo de la proteasa de la región pol; las posiciones nº 215 hasta nº 277 corresponden a una parte del dominio de transcriptasa inversa. En el caso de la proteína derivada de R11-ORF-2 se trata por lo tanto de un posible retro-transposón.

Ejemplo 7

Péptidos de fijación a MHC potenciales en las regiones que codifican los dos cuadros de lectura de R11, R11-ORF-1 y R11-ORF-2.

Epítopos potenciales para péptidos dentro de los dos cuadros de lectura de R11 según SEQ ID NO: 2 y 3 respectivamente 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 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 epítopos para CTL's inmunógenos; los péptidos determinados se enumeran en la Tabla 1 (R11-ORF-1) y en la Tabla 2 (R11-ORF-2). Mediante un modo análogo de proceder se pudieron determinar otros epítopos potenciales de péptidos para otros tipos de HLA o péptidos 8 y 10 meros.

Tabla 1

Candidatos a péptidos inmunógenos de R11-ORF-1 (401 aminoácidos)

5	Posición inicial en SEQ ID NO: 2	Secuencia	HLA
	35	SPPTPTVTL	HLA-B7
10	85	LSEEINNLR	HLA-A1
	112	KLTEENTTL	HLA-A*0201
15	113	LTEENTTLR	HLA-A1
	135	IELRGAAAA	HLA-B*4403
	172	FMAQCQIFM	HLA-A*0201
20	199	SMMTGRAAR	HLA-A3
	205	AARWASAKL	HLA-B7
25	211	AKLERSHYL	HLA-B14
	252	QGMGSVIDY	HLA-B*4403
	274	NEPALIDQY	HLA-B*4403
30	315	RRLARAAAA	HLA-B14
	325	KPRSPPRAL	HLA-B7
35	354	RMRLTQEEK	HLA-A3
	346	PTEPVGGAR	HLA-A1

Tabla 2
Candidatos a péptidos inmunógenos de R11-ORF-2 (357 aminoácidos)

5	Posición inicial en SEQ ID NO: 3	Secuencia	HLA
	1	MLQIHLPGR	HLA-A3
10	4	IHLPGRHTL	HLA-A*0201, HLA-B14
	5	HLPGRHTLF	HLA-A3
15	31	YVAQNGIPL	HLA-B7
	39	LRIKDWPIIL	HLA-B14
20	46	ILVEAIDGR	HLA-A3
	53	GRPIASGPV	HLA-B14
25	64	ETHDLIVDL	HLA-B14
	71	DLGDHREVL	HLA-A*0201, HLA-B7, HLA-B14
30	73	GDHREVLSF	HLA-B*4403
	85	QSPFFPVVL	HLA-B7
35	92	VLGPRWLSA	HLA-A*0201
	97	WLSAHDPMI	HLA-A*0201
	110	RSIVFDSEY	HLA-B*4403
	112	IVFDSEYCR	HLA-A3
	134	PPPAQPPL	HLA-B7

31

	141 .	PLYYPVDGY	HLA-A3
5	150	RVYQPVRYY	HLA-A3
	152	YQPVRYYYV	HLA-A*0201
	155	RYYYYVQNV	HLA-B14
10	59	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
20	191	IPSGHVYSL	HLA-B7, HLA-A*0201
	198	SLSEPEMAA	HLA-A*0201
	199	LSEPEMAAL	HLA-A1
25	202	PEMAALRDF	HLA-B*4403
	203	EMAALRDFV	HLA-A*0201
30	206	ALRDFVARN	HLA-A*0201
	211	VARNVKDGL	HLA-B7
	223	TIAPNGAQV	HLA-A*0201
35	224	IAPNGAQVL	HLA-B7
	231	VLQVKRGWK	HLA-A3

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

Bibliografía

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402 (1997).
- 5 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.
- 10 Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe, K. L. y Sonnhammer, E. L. The Pfam Protein Families Database. Nucleic Acids Res. 28, 263-266 (2000).
- Becker, D., Kuhn, U., Lempertz, U., Enk, A., Saloga, J., y Knop, J. (1997), J. Immunol. Methods 203, 171-180.
- 15 Blake, J., Johnston, J.V., Hellström, K.E., Marquardt, H., y Chen, L. (1996), J. Exp. Med. 184, 121-130.
- 20 Boon, T, J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, y A. Van Pel (1994), Annu.Rev.Immunol. 12: 337-365
- Boon T, (1998), Tumor antigens recognized by cytolytic T cells. Cancer Vaccine Week – Interantional Symposium, Nueva York, Oct. 1998; resumen S01
- 25 Bork, P. et al. (1992). What ´s in a genome? Nature 358: 287.
- Bork, P. y Koonin, E. V. (1998). Predicting functions from protein sequences - where are the bottlenecks? Nature Genetics 18: 313-318.
- 30 Boulianne, G. L., y colaboradores (1984), Nature 312, 643-646
- 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

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

5

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

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

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

15 Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M. y Barton, G. J. Jpred: a consensus secondary structure prediction server. Bioinformatics 14, 892-893 (1998).

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),

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

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., y 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., y Pauli, B.U. (1997), J. Biol. Chem. 272, 27853-27861.

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

30

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

- Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H.I., Simons, J.W., Karasuyamã, 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.
- 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
- Griffiths, A.D., y colaboradores (1994), EMBO J. 13, 3245-3260
- Grosveld, F. y Kollias, G. Transgenic Animals, Academic Press (1992).
- Halliday, GM, Patel, A, Hunt, MJ, Tefany, FJ, y Barnetson RS (1995), World J. Surg. 19, 352-358
- Higgins, D. G., Thompson, J. D. y Gibson, T. J. Using CLUSTAL for Multiple Sequence Alignments. Methods Enzymol. 266, 383-402 (1996).
- Hofmann, K., Buchner, P., Falquet, L. y Bairoch, A. The PROSITE database, its status in 1999. Nucleic Acids Res. 27, 215-219 (1999).
- 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.
- Jager, E., Chen, Y.T., Drijfhout, J.W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L.J., y Knuth, A. (1998), J. Exp. Med. 187, 265-270.
- Jakobovits, A., (1995), Curr. Opin. Biotechnol. 6, 561-566

- Jameson, BA y Wolf, H (1988), The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. Comput. Appl. Biosci. 4, 181-186
- Jessup, JM y Loda, M (1998), Prognostic markers in rectal carcinoma. Semin. Surg. Oncol. 15, 131-140.
- Kastan , M. B. (coordinador de edición) „Genetic Instability and Tumorigenesis" in Curr. Top. Microbiol. Immunol. 221 (1997).
- 10 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.
- Kawakami, Y, Robbins, PF, y Rosenberg, SA (1996), Keio J. Med. 45, 100-108
- 15 Koonin, E. V., Bork, P., y Sander, C. (1994). Yeast chromosome III: New gene functions. EMBO J. 13: 493-503.
- Köhler, G. y Milstein, C. (1975), Nature 265, 495-497
- 20 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
- 25 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
- 30 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.,
5 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
- 10 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),
15 *Cancer* 83, 2259-2269
- Neuberger, M.S., y colaboradores (1984), *Nature* 312, 604-608
- Pardoll, D. M.(1998), *Nature Medicine* 4, 525-531
- 20 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.
- 25 Paterson Y, Ikonomidis G (1996), *Curr. Opin. Immunol.* 5, 664-669
- Pearson, W. R. y Lipman, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448 (1988).
- 30 Pusztai, L., Lewis, C. E., y Yap, E. (coordinadores de edición) „Cell Proliferation in Cancer" Oxford University Press (1996).

- v2
- 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
- 5 Ravaoli, A., Bagli, L., Zucchini, A., y Monti, F. (1998), Cell. Prolif. 31, 113-126
- Revillion, F, Bonnetterre, J, y Peyrat, JP (1998), Eur. J. Cancer 34, 791-808
- 10 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
- 15 Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., y Sette, A. (1993), Cell 74, 929-937.
- Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R.,
20 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
- 25 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
30 (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94, 3262-3267
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. y Bork, P. SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Res. 28, 231-234 (2000).

- Schweighoffer, T. (1997), *Onc. Res.* 3, 164-176
- Seeber, S. y Schütte, J. (Hrsg.) „Therapiekonzepte Onkologie“ Springer Verlag 1998.
- 5 Selvakumar, A., Mohanraj, B.K., Eddy, R.L., Shows, T.B., White, P.C., y Dupont, B. (1992) *Immunogenetics* 36, 175-181.
- Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.-F., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., y Chisari, F.V. (1994), *J. Immunol.* 153, 5586-5592.
- 10 Sharp, P.M. y Lloyd, A. T. (1993). Regional base composition variation along yeast chromosome III: Evolution of chromosome primary structure. *Nucleic Acids Res.* 21: 179-183.
- 15 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.
- 20 Streilein, J.W. (1995), *Science* 270, 1158-1159.
- 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
- 25 Toes, R.E., Hoebe, 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,.
- 30 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
- 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
- 5
- van der Burg, S.H., y colaboradores (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., 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
- 10
- 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.
- 15
- Vaughan, T.J., y colaboradores (1998), Nature Biotechnol. 16, 535-539
- Velculescu, VE, Zhang, L, Vogelstein, B, y Kinzler, KW (1995), Science 270, 484-487
- 20
- Wang, L., et al., (1997), Mol. Immunol. 34, 609-618
- Wang, RF (1997), Mol. Med. 3, 716-731
- 25
- Winter, G., y colaboradores (1994), Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455
- Wölfel T, Schneider, J, Zum Buschenfelde, Meyer, KH, Rammensee, HG, Rotzschke, O, y Falk, K (1994), Int. J. Cancer 57, 413-418
- 30
- 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

45

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.

- 5 Zhang, Y. y colaboradores (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-432.

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

- 10 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.

REIVINDICACIONES

1. Molécula aislada de ADN que presenta la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO: 1 o un polinucleótido, que se hibrida con esta molécula de ADN en condiciones rigurosas, o un fragmento de éste.
2. Molécula aislada de ADN según la reivindicación 1, que contiene una secuencia de ADN que codifica un antígeno asociado con un tumor, que tiene las propiedades inmunógenas del polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2 o de un antígeno asociado con un tumor, del que el polipéptido representado en SEQ ID NO: 2 constituye una secuencia parcial, o fragmentos de éste.
3. Molécula aislada de ADN según la reivindicación 1, que contiene una secuencia de ADN que codifica un antígeno asociado con un tumor, que tiene las propiedades inmunógenas del polipéptido con la secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID NO: 3, o fragmentos de éste.
4. Antígeno asociado con tumores con la denominación R11-ORF-1, caracterizado porque presenta la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 2 o contiene a ésta como secuencia parcial.
5. Fragmento de proteína o péptido inmunógeno, caracterizado porque se deriva del antígeno asociado con un tumor, que se define en la reivindicación 4.
6. (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación 5, que provoca una respuesta inmunitaria humoral.
7. (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación 5, el cual, o cuyos productos de degradación, son presentados por moléculas de MHC y provocan una respuesta inmunitaria celular.
8. Péptido inmunógeno según la reivindicación 7, seleccionado entre el grupo de péptidos conformes a SEQ ID NO: 88 hasta 102.
9. (Poli)péptido inmunógeno según una de las reivindicaciones 5 a 8, 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.
10. 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 5 a 9.

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, caracterizada porque contiene diferentes péptidos inmunógenos derivados de R11-ORF-1.

12. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 u 11, caracterizada porque contiene uno o varios péptidos derivados de R11-ORF-1 en mezcla con otros
5 péptidos derivados de antígenos asociados con tumores.

13. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 ó 12, caracterizada porque los péptidos se fijan a por lo menos dos diferentes tipos de HLA.

14. Antígeno asociado con un tumor con la denominación R11-ORF-2, caracterizado porque presenta la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO:
10 3.

15. Fragmento de proteína o péptido inmunógeno, caracterizado porque se deriva del antígeno asociado con un tumor que se define en la reivindicación 14.

16. (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación 15, que provoca una respuesta inmunitaria humoral.

15 17. (Poli)péptido inmunógeno según la reivindicación 15, el cual, o cuyos productos de degradación, son presentados por moléculas de MHC y provocan una respuesta inmunitaria celular.

18. Péptido inmunógeno según la reivindicación 17, seleccionado entre el grupo de péptidos conformes a SEQ ID NO: 44 hasta 87.

20 19. (Poli)péptido inmunógeno según una de las reivindicaciones 15 a 18, 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.

20 20. Composición farmacéutica para la administración por vía parenteral, tópica, oral o local, caracterizada porque contiene como componente activo uno o
25 varios (poli)péptidos inmunógenos según una de las reivindicaciones 15 a 19.

21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, caracterizada porque contiene diferentes péptidos inmunógenos, derivados de R11-ORF-1.

22. Composición farmacéutica según la reivindicación 21, caracterizada
30 porque contiene uno o varios péptidos derivados de R11-ORF-2 en mezcla con péptidos derivados de otros antígenos asociados con tumores.

23. Composición farmacéutica según la reivindicación 21 ó 22, caracterizada porque los péptidos se fijan a por lo menos dos diferentes tipos de HLA.

24. Molécula de ADN recombinante, que contiene una molécula de ADN

según una de las reivindicaciones 1 a 3.

25. Molécula de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 3 ó 24, para la inmunoterapia de enfermedades de cáncer, induciendo el (poli)péptido R11-ORF-1 o R11-ORF-2 expresados por la molécula de ADN, o un fragmento de éste una
5 respuesta inmunitaria frente a células de tumores del paciente, que expresan R11-ORF-1 y/o R11-ORF-2.

(26) Utilización de células que expresan el antígeno definido en las reivindicaciones 5 y/o 15 para la preparación de una vacuna contra el cáncer.

27. Anticuerpos contra un (poli)péptido definido en una de las reivindicaciones
10 4 a 9.

28. Anticuerpos contra un (poli)péptido definido en una de las reivindicaciones 14 a 19.

29. Anticuerpo según las reivindicaciones 27 ó 28, caracterizado porque es monoclonal.

15 30. Anticuerpos según una de las reivindicaciones 27 a 29 o para la terapia y el diagnóstico de enfermedades de cáncer, que están asociadas con la expresión de R11.

RESUMEN

Antígenos asociados con tumores, péptidos inmunógenos derivados de ellos y moléculas de ADN que codifican a éstos, así como su utilización en la

5 inmunoterapia de enfermedades de cáncer.

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Antígeno asociado a tumores R11

<130> 12211aa

<140>

<141>

<160> 102

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6582

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1) .. (217)

<220>

<221> CDS

<222> (218) .. (1423)

<220>

<221> no seguro

<222> (1424) .. (1497)

<220>

<221> CDS

<222> (1498) .. (2571)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (2572) .. (6582)

<400> 1

acacgggctt caacttcggg ttggtgtgtgt cgaagaaacc tgactgggac ctgaggagaa 60

cagcggagaa ggtccaccca gcttggcgaa aggtccgctg agcgggctgt cgtccggagc 120

cactccgggc tgaggagcac ccagtggaga ccggcgctgg ctccaggtgtg ggaccctatc 180

cttctgtct togcagagga gtcttcgggt ggtgagt atg cga aat aag cgg gtt 235

Met Arg Asn Lys Arg Val

ttg aaa aca aaa aaa aga agg agt gga aga ggg ggc cag gat cca ggc	283
Leu Lys Thr Lys Lys Arg Arg Ser Gly Arg Gly Gly Gln Asp Pro Gly	
10 15 20	
ctc cat ccc cac aga agt gaa gct aca gct ggg agg tct cct ccc acc	331
Leu His Pro His Arg Ser Glu Ala Thr Ala Gly Arg Ser Pro Pro Thr	
25 30 35	
cca acc gtc acc ctg ggt ccc gac tgc cca cct cct cct cct ccc cct	379
Pro Thr Val Thr Leu Gly Pro Asp Cys Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro	
40 45 50	
ccc ccc aac aac aac aac aac aac aac tcc aag cac acc ggc cat aag	427
Pro Pro Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Lys His Thr Gly His Lys	
55 60 65 70	
agt gcg tgt gtc ccc aac atg acc gaa cga aga agg gac gag ctc tct	475
Ser Ala Cys Val Pro Asn Met Thr Glu Arg Arg Arg Asp Glu Leu Ser	
75 80 85	
gaa gag atc aac aac tta aga gag aag gtc atg aag cag tog gag gag	523
Glu Glu Ile Asn Asn Leu Arg Glu Lys Val Met Lys Gln Ser Glu Glu	
90 95 100	
aac aac aac ctg cag agc cag gtg cag aag ctc aca gag gag aac acc	571
Asn Asn Asn Leu Gln Ser Gln Val Gln Lys Leu Thr Glu Glu Asn Thr	
105 110 115	
acc ctt cga gag caa gtg gaa ccc acc cct gag gat gag gat gat gac	619
Thr Leu Arg Glu Gln Val Glu Pro Thr Pro Glu Asp Glu Asp Asp Asp	
120 125 130	
atc gag ctc cgc ggt gct gca gca gct gct gcc cca ccc cct cca ata	667
Ile Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ala Ala Pro Pro Pro Pro Ile	
135 140 145 150	
gag gaa gag tgc cca gaa gac ctc cca gag aag ttc gat ggc aac cca	715
Glu Glu Glu Cys Pro Glu Asp Leu Pro Glu Lys Phe Asp Gly Asn Pro	
155 160 165	
gac atg ctg gct cct ttc atg gcc cag tgc cag atc ttc atg gaa aag	763
Asp Met Leu Ala Pro Phe Met Ala Gln Cys Gln Ile Phe Met Glu Lys	
170 175 180	
agc acc agg gat ttc tca gtt gat cgt gtc cgt gtc tgc ttc gtg aca	811
Ser Thr Arg Asp Phe Ser Val Asp Arg Val Arg Val Cys Phe Val Thr	
185 190 195	
agc atg atg acc ggc cgt gct gcc cgt tgg gcc tca gca aag ctg gag	859
Ser Met Met Thr Gly Arg Ala Ala Arg Trp Ala Ser Ala Lys Leu Glu	
200 205 210	
cgc tcc cac tac ctg atg cac aac tac cca gct ttc atg atg gaa atg	907
Arg Ser His Tyr Leu Met His Asn Tyr Pro Ala Phe Met Met Glu Met	

215		220		225		230										
aag	cat	gtc	ttt	gaa	gac	oct	cag	agg	oga	gag	gtt	gcc	aaa	cgc	aag	955
Lys	His	Val	Phe	Glu	Asp	Pro	Gln	Arg	Arg	Glu	Val	Ala	Lys	Arg	Lys	
				235						240					245	

atc aga cgc ctg cgc caa ggc atg ggg tct gtc atc gac tac tcc aat 1003
 Ile Arg Arg Leu Arg Gln Gly Met Gly Ser Val Ile Asp Tyr Ser Asn
 250 255 260

gct ttc cag atg att gcc cag gac ctg gat tgg aac gag oct gog ctg 1051
 Ala Phe Gln Met Ile Ala Gln Asp Leu Asp Trp Asn Glu Pro Ala Leu
 265 270 275

att gac cag tac cac gag ggc ctc agc gac cac att cag gag gag ctc 1099
 Ile Asp Gln Tyr His Glu Gly Leu Ser Asp His Ile Gln Glu Glu Leu
 280 285 290

tcc cac ctc gag gtc gcc aag tog ctg tct gct ctg att ggg cag tgc 1147
 Ser His Leu Glu Val Ala Lys Ser Leu Ser Ala Leu Ile Gly Gln Cys
 295 300 305 310

att cac att gag aga agg ctg gcc agg gct gct gca gct cgc aag oca 1195
 Ile His Ile Glu Arg Arg Leu Ala Arg Ala Ala Ala Arg Lys Pro
 315 320 325

cgc tog oca ccc cgg gog ctg gtg ttg oct cac att gca agc cac cac 1243
 Arg Ser Pro Pro Arg Ala Leu Val Leu Pro His Ile Ala Ser His His
 330 335 340

cag gta gat cca acc gag ccg gtg gga ggt gcc cgc atg cgc ctg aog 1291
 Gln Val Asp Pro Thr Glu Pro Val Gly Gly Ala Arg Met Arg Leu Thr
 345 350 355

cag gaa gaa aaa gaa aga cgc aga aag ctg aac ctg tgc ctc tac tgt 1339
 Gln Glu Glu Lys Glu Arg Arg Arg Lys Leu Asn Leu Cys Leu Tyr Cys
 360 365 370

gga aca gga ggt cac tac gct gac aat tgt oct gcc aag gcc tca aag 1387
 Gly Thr Gly Gly His Tyr Ala Asp Asn Cys Pro Ala Lys Ala Ser Lys
 375 380 385 390

tct tog ccg gog gga aac tcc ccg gcc ccg ctg tag agggaccttc 1433
 Ser Ser Pro Ala Gly Asn Ser Pro Ala Pro Leu
 395 400

agcgacccgg ccagaaataa taaggctccc acaagatgat gccatcttc cacacttgca 1493

agtg atg ctc cag att cat ctt ccg ggc aga cac acc ctg ttc gtc cga 1542
 Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu Phe Val Arg
 405 410 415

gcc atg atc gat tct ggt gct tct ggc aac ttc att gat cac gaa tat 1590
 Ala Met Ile Asp Ser Gly Ala Ser Gly Asn Phe Ile Asp His Glu Tyr
 420 425 430

gtt gct caa aat gga att cct cta aga atc aag gac tgg oca ata ctt 1638
 Val Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu Arg Ile Lys Asp Trp Pro Ile Leu
 435 440 445

gtg gaa gca att gat ggg cgc ccc ata gca tog ggc oca gtt gtc cac	1686
Val Glu Ala Ile Asp Gly Arg Pro Ile Ala Ser Gly Pro Val Val His	
450 455 460 465	
 gaa act cac gac ctg ata gtt gac ctg gga gat cac oga gag gtg ctg	1734
Glu Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu	
470 475 480	
 tca ttt gat gtg act cag tct cca ttc ttc cct gtc gtc cta ggg gtt	1782
Ser Phe Asp Val Thr Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu Gly Val	
485 490 495	
 cgc tgg ctg agc aca cat gat ccc aat atc aca tgg agc act oga tct	1830
Arg Trp Leu Ser Thr His Asp Pro Asn Ile Thr Trp Ser Thr Arg Ser	
500 505 510	
 atc gtc ttt gat tct gaa tac tgc cgc tac cac tgc oga atg tat tct	1878
Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg Tyr His Cys Arg Met Tyr Ser	
515 520 525	
 cca ata cca cca tog ctc cca cca cca gca cca caa cag oca ctc tat	1926
Pro Ile Pro Pro Ser Leu Pro Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Leu Tyr	
530 535 540 545	
 tat oca gta gat gga tac aga gtt tac caa cca gtg agg tat tac tat	1974
Tyr Pro Val Asp Gly Tyr Arg Val Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr	
550 555 560	
 gtc cag aat gtg tac act cca gta gat gag cac gtc tac oca gat cac	2022
Val Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val Asp Glu His Val Tyr Pro Asp His	
565 570 575	
 cgc ctg gtt gac cct cac ata gaa atg ata cct gga gca cac agt att	2070
Arg Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met Ile Pro Gly Ala His Ser Ile	
580 585 590	
 ccc agt gga cat gtg tat tca ctg tcc gaa cct gaa atg gca gct ctt	2118
Pro Ser Gly His Val Tyr Ser Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu	
595 600 605	
 oga gat ttt gtg gca aga aat gta aaa gat ggg cta att act oca aog	2166
Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu Ile Thr Pro Thr	
610 615 620 625	
 att gca cct aat gga gcc caa gtt ctc cag gtg aag agg ggg tgg aaa	2214
Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys	
630 635 640	
 ctg caa gtt tct tat gat tgc oga gct cca aac aat ttt act atc cag	2262
Leu Gln Val Ser Tyr Asp Cys Arg Ala Pro Asn Asn Phe Thr Ile Gln	
645 650 655	
 aat cag tat cct cgc cta tct att cca aat tta gaa gac caa gca cac	2310
Asn Gln Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu Glu Asp Gln Ala His	

55

660		665		670	
ctg gca acg tac act gaa ttc gta cct caa ata cct gga tac caa aca					2358
Leu Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val Pro Gln Ile Pro Gly Tyr Gln Thr					
675		680		685	

tac ccc aca tat ggc ggc tac ccc acc tac cca gta gga ttc gcc tgg 2406
Tyr Pro Thr Tyr Ala Ala Tyr Pro Thr Tyr Pro Val Gly Phe Ala Trp
690 695 700 705

tac cca gtg gga cga gac gga caa gga aga tca cta tat gta oct gtg 2454
Tyr Pro Val Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val Pro Val
710 715 720

atg atc act tgg aat cca cac tgg tac cgc cag oct ccc gta cca cag 2502
Met Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Val Pro Gln
725 730 735

tac ccc ccc cca cag ccc ccc oct cca cca cca cca ccc ccc ccc oct 2550
Tyr Pro Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
740 745 750

cca tct tac agt acc ctg taa ataactgtca tgccttcag gatctctgcc 2601
Pro Ser Tyr Ser Thr Leu
755 760

ctcaaaattt attctgttc agtttctcaa tcagtactg tgtgctaaat tttaggctac 2661

tgtatcttca ggcacactga ggcacatctt ctctgaaacg gctatggag gttaggccca 2721

ctctggactg gcacacatcc taaagcaca aaagaccttc aacattttct gagagcaaca 2781

gagtatttgc caataaatga tctctcattt ttccacttg actgccaatc taactaaaat 2841

aattaataag tttactttcc agccagtctt ggaagtctgg gttttaactg ccaaaacctc 2901

catcaccatc taaattatag gctgccaat ttgctgttta acatttacag agaagctgat 2961

acaaaagcag gaaatgctga tttctttatg gagggggaga caggaggag gaggacatga 3021

ctttctctgc gggttoggta cctctttttt aaatcactgg aggactgagg ccttattaag 3081

gaagccaaaa ttatoggctc agtgtggaaa ggcttcogtg atctctctgc tgcacctta 3141

gaaacttcac cgtcttcaaa ctccatttcc atggttctgt taattctcaa ggagcagcaa 3201

ctcgactggt tctccagga gcaggaaaa ccttgtgac atgaaacatc tcaggctga 3261

aaagaaagtg ctctctcaga tggactcttg catgttaaga ctatgtcttc acatcatggt 3321

gcaaatcaca tgtacccaat gactcggctt ttgacacaac accttacct catcatgcca 3381

tgatggttc cacaagcat taaacctggt aaccagagat tactggctggc tocagcgttg 3441

ttagatgttc atgaaatgtg accactctc aatcaccttt gagggctaaa gagtagcaca 3501

tcaaaaggac tccaaaatcc catacccaac tcttaagaga tttgtcctgg tacttcagaa 3561

agaattttca tgagtgttct taattggctg gaaaagcacc agctgaogtt ttggaagaat 3621

ctatccatgt gtctgctoc' atatgcatct gggcatttca tcttcagtoc cctcattaga 3681
ctgtagcatt aggatgtgtg gagagaggag aatgattta gcacccagat tcacactoct 3741
atgctcggaa gggggacatc tttgaagaag aggaattagg gctgtggaca ctgtcttgag 3801
gatgtggact tcttagtga gctccacatt acttgatgtt aaccacttca aaaggatcag 3861
aatccagta atgaaaaagg tccctctaga ggatggagct gatgtgaagc tgccaatgga 3921
tgaaaagct cagaagcaa ctcaaaggac tcaaagcaac ggacaacaca agagtgtctt 3981
tcagccagct gacacctctg atgtccctcg gaagctttgt gctaacctgg gactgctga 4041
cttcttttag cctggctoct tgctactaoc ttgaactgtt ttatctaoc tctcttttc 4101
tgtttaattc tttgctactg ccattgaccc tgcgcagga ttgtgtcat tttctgct 4161
ggctgctgag actocatttt gctgcacac acagagatgt aagaggcagg cttaattgc 4221
caaagcacag tttgagcagt agaaaacaac atgggtgata tctcaaattg cctgacatga 4281
agaggagtct aacggggaag tttcactttt catcagcatc atctttcaca tgttcattat 4341
catcogctct tattcttga tggttaaaca cttaaaattt ttagtataat ttttagtgtg 4401
ttttgaagtg gtgactaggc tttcaaaaac ttccattgaa ttacaaagca ctatccagtt 4461
cttattgtta aactaagtaa aatgataag taacatagtg taaaatattc ctttactgtg 4521
aacttcttac aatgctgtga atgagaggct cctcagaact ggagcatttg tataataatt 4581
catcctgttc atcttcaatt ttaacatcat atataattc aattctatca attgggctt 4641
taaaaatcat ataaaaggat ataaaatttg aaaagagaa octaattggc tatttaatcc 4701
aaaacaactt ttttttttcc ttcaatggaa tcagaaagct tgtcaatcac tcatgtgtt 4761
tagagtaatt acttttaaaa tgggtcattt gtgcttctga actattttga agagtcactt 4821
ctgtttact caagtatcaa ttcatctcc atacatttg attcaagttg tttttgtca 4881
aatttacagt tgtcaattga tcttcaagct gcagggtgc tagaaatggg cctgtgctg 4941
tagccctggc atgtgcacac ggacatttgc caccactga agcaaaagtc tggagaagtt 5001
caccaagac aagaacgatt agggaaaata tgctgctgtg ggttaacaac tcagaaagtc 5061
cctgatcac atttgctgt ttactaaagc ttgtgattaa ctttttggca gtgtgtacta 5121
tgctctattg ctatatatgc tatctataa tgtagatgtt aaggataagt aattctaat 5181
ttattattct atagttttga agtttggta agtttcttt cactcaattg atttattttg 5241

ttgttaatca aatttatgtt aattggatcc tttaaatttt ttttggcatt ttccaacaaa 5301
 aatggcttta ttcataagaa aggaaaaaaa tcaatggaat ttgatattta aagaagttag 5361
 aaagggagca aaataaaaaa cataaaggag atagatgaat tagtaagcaa atcagtagtc 5421
 gagtttttca aactggcaaa attaattaat tgacttttag cccaaattta cattgttaat 5481
 taaatcaaga aggaagaaga tctaagagct cccattgata ggcaagocaa gagagaacta 5541
 gctaaattta tcatgctagg atattgaaac acagaaagtt tacatacatt tatgaagggt 5601
 caatttagtt tggacagtga ggtatttgtc ttagtggaaa aaaggagaat tagtctgac 5661
 aaatcgtgaa gtaatacagt gaacttgag gtgcacaaaa taagagggcc acatctatat 5721
 ggtgcagtct ggaattctgt ttaagtttgt aggtacctct tggacttctg aattgatoca 5781
 gttgtcatcc accacagaca ttcacatca gatacagaca gttccaagat tgacaacaga 5841
 gaacaacctg ctgaaagac ctgggcagaa atggagagcc ctgogggaac catgctacat 5901
 tttcatctaa agagagaatg cacatctgat gagactgaaa gttctttgtt gttttagatt 5961
 gtagaatggt attgaattgg tctgtggaaa attgcattgc ttttatttct ttgtgtaac 6021
 aagtttaagt aataggggat atataatcat aagcatttta gggtagggag gactattaag 6081
 taattttaag tgggtgggt tatttagaat gttagaataa tattatgtat tagatatgc 6141
 tataagtga catggtact tacttgtaac cctttacct ataattgcta tcttaaaaga 6201
 tttcaataa actgggggg aactgcagg agaccaact atttagagcg aattggacat 6261
 ggataaaaac cccagtggga gaaagttaa aggtgattag attaataatt taatagagga 6321
 tgagtgaact ctgataaatt actgctagaa tgaacttgc aatgatggat ggtaaatttt 6381
 catggaagtt ataaaagtga taaataaaaa ccttgcttt taccctgtc agtagcctc 6441
 ctctaccac tgaacccat tgcctacc cctcttcta actttattgc tgtattctct 6501
 tcaactata tttctctta ttgttaata ttgcattgct gttacaataa aaattcaata 6561
 aagatttagt ggttaagtgc t 6582

<210> 2

<211> 401

<212> PROTEINA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Arg Asn Lys Arg Val Leu Lys Thr Lys Lys Arg Arg Ser Gly Arg
  1             5             10             15

Gly Gly Gln Asp Pro Gly Leu His Pro His Arg Ser Glu Ala Thr Ala
  20             25             30

Gly Arg Ser Pro Pro Thr Pro Thr Val Thr Leu Gly Pro Asp Cys Pro
  35             40             45

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser
  50             55             60

Lys His Thr Gly His Lys Ser Ala Cys Val Pro Asn Met Thr Glu Arg
  65             70             75             80

Arg Arg Asp Glu Leu Ser Glu Glu Ile Asn Asn Leu Arg Glu Lys Val
  85             90             95

Met Lys Gln Ser Glu Glu Asn Asn Asn Leu Gln Ser Gln Val Gln Lys
 100             105             110

Leu Thr Glu Glu Asn Thr Thr Leu Arg Glu Gln Val Glu Pro Thr Pro
 115             120             125

Glu Asp Glu Asp Asp Asp Ile Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ala Ala
 130             135             140

Ala Pro Pro Pro Pro Ile Glu Glu Glu Cys Pro Glu Asp Leu Pro Glu
 145             150             155             160

Lys Phe Asp Gly Asn Pro Asp Met Leu Ala Pro Phe Met Ala Gln Cys
 165             170             175

Gln Ile Phe Met Glu Lys Ser Thr Arg Asp Phe Ser Val Asp Arg Val
 180             185             190

Arg Val Cys Phe Val Thr Ser Met Met Thr Gly Arg Ala Ala Arg Trp
 195             200             205

Ala Ser Ala Lys Leu Glu Arg Ser His Tyr Leu Met His Asn Tyr Pro
 210             215             220

Ala Phe Met Met Glu Met Lys His Val Phe Glu Asp Pro Gln Arg Arg
 225             230             235             240

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

```

Val Ile Asp Tyr Ser Asn Ala Phe Gln Met Ile Ala Gln Asp Leu Asp
260 265 270

Trp Asn Glu Pro Ala Leu Ile Asp Gln Tyr His Glu Gly Leu Ser Asp
275 280 285

His Ile Gln Glu Glu Leu Ser His Leu Glu Val Ala Lys Ser Leu Ser
290 295 300

Ala Leu Ile Gly Gln Cys Ile His Ile Glu Arg Arg Leu Ala Arg Ala
305 310 315 320

Ala Ala Ala Arg Lys Pro Arg Ser Pro Pro Arg Ala Leu Val Leu Pro
325 330 335

His Ile Ala Ser His His Gln Val Asp Pro Thr Glu Pro Val Gly Gly
340 345 350

Ala Arg Met Arg Leu Thr Gln Glu Glu Lys Glu Arg Arg Arg Lys Leu
355 360 365

Asn Leu Cys Leu Tyr Cys Gly Thr Gly Gly His Tyr Ala Asp Asn Cys
370 375 380

Pro Ala Lys Ala Ser Lys Ser Ser Pro Ala Gly Asn Ser Pro Ala Pro
385 390 395 400

Leu

<210> 3

<211> 357

<212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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
50 55 60

Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser
65 70 75 80

Phe Asp Val Thr Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu Gly Val Arg
 85 90 95
 Trp Leu Ser Thr His Asp Pro Asn Ile Thr Trp Ser Thr Arg Ser Ile
 100 105 110
 Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg Tyr 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
 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
 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
 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
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Tyr Asp Cys Arg Ala Pro Asn Asn Phe Thr Ile Gln Asn
 245 250 255
 Gln Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu Glu Asp Gln Ala His Leu
 260 265 270
 Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val Pro Gln Ile Pro Gly Tyr Gln Thr Tyr
 275 280 285
 Pro Thr Tyr Ala Ala Tyr Pro Thr Tyr Pro Val Gly Phe Ala Trp Tyr
 290 295 300
 Pro Val Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val Pro Val Met
 305 310 315 320
 Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Val Pro Gln Tyr
 325 330 335
 Pro Pro Pro Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 340 345 350
 Ser Tyr Ser Thr Leu
 355

<210> 4
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 4
ctagcccacc atggcatctg cagccaogtg a 31

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

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

<400> 5
agcttcaogt ggctgcagat gccatggtgg 30

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 6
ctagcccacc atggcatctg cagccaogtga 30

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

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

<400> 7
agcttcaogt ggctgcagatg ccacggtgg 29

<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 8
ctagcccacc atggcatctg cacaogtga 29

<210> 9
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 9
agcttcaogt gtgcagatgc catggtgg 28

<210> 10
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 10
gggoggtagg cgtgtaoggt ggg 23

<210> 11
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 11
gcaactagaa ggcacagtog aggctg 26

<210> 12
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 12
gtttggacag tgaggtattt gtcttag 27

<210> 13
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 13
ctttccagca ggttggtctc tgttgtc 27

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 14
tgaoggggtc acccacactg tgcccatcta 30

<210> 15
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 15
ctagaagcat tgoggtggac gatggaggg 29

<210> 16
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 16
aaggtgaagg toggagtcaa cg 22

<210> 17
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 17
ggcagagatg atgaccttt tggc 24

<210> 18
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 18
tattttgctc cctttctaac ttcttt 26

<210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 19
tttcactttt catcagcatc atctttcaca 30

<210> 20
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 20
ogttagactc ctcttcacgt caggcaa 27

<210> 21
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 21
ggtgacacta tagaaggtag gc 22

<210> 22
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 22
caggcctgag atgtttcatg tcacaagg 28

<210> 23
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 23
gcatttcctg ogtttgatc agtttctct 29

<210> 24
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 24
accagcacca caacogccac tctattatcc 30

<210> 25
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 25
catatagtga tcttccttgt cgtctogtc 30

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

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 26
gggcccatca attgcttcca caagta

26

<210> 27
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 27
gcagagctog tttagtgaac c

21

<210> 28
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 28
ggccagaaat aataaggtcc ccacaagatg

30

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

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 29

agctttctgc gtctttcttt ttcttcctg

29

<210> 30
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 30

aggtagccaa gtagctgtct gctctg

26

<210> 31
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 31

tggtagttg tgcattcaggt agtgggagag ctccagc

37

<210> 32
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 32

ctogaagggt ggtgtttctcc tctgtga

27

<210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 33
 gagctogtcc cttcttoggg og 22

<210> 34
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 34
 cataagagtg ogtgtgtccc caacatgacc gaacgaagaa 40

<210> 35
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 35
 togtcccttc ttogttoggt catgttgggg acacaogcac tcttatg 47

<210> 36
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 36
 ttcttoggg ggtcatgttg gggacacag cactcttatg 40

<210> 37
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 37
cagggtagcg gttgggggtgg gaggagac 28

<210> 38
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 38
gcttcacttc tgtgggggatg gaggcctgg 29

<210> 39
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 39
atgogaaata agcgggtttt ga 22

<210> 40
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 40
ogcagaggag tctogogtg gtgagtatg 29

<210> 41
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 41
ggctcaggtg tgggacccca tcttctctg 29

<210> 42
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 42
gctcoggaog acagccogct cagoggacc 29

<210> 43
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 43
gaagaaacct gactgogccc tgag 24

<210> 44
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 44
Met Leu Gln Ile His Leu Pro Gly Arg
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 45
Ile His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
His Leu Pro Gly Arg His Thr Leu Phe
1 5

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

<400> 47
Tyr Val Ala Gln Asn Gly Ile Pro Leu
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 48
Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 49
Ile Leu Val Glu Ala Ile Asp Gly Arg
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 50
Gly Arg Pro Ile Ala Ser Gly Pro Val
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 51
Glu Thr His Asp Leu Ile Val Asp Leu
1 5

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

<400> 52
Asp Leu Gly Asp His Arg Glu Val Leu
1 5

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

<400> 53
Gly Asp His Arg Glu Val Leu Ser Phe
1 5

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

<400> 54
Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Val Leu
1 5

175

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

<400> 55
Val Leu Gly Pro Arg Trp Leu Ser Ala
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 56
Trp Leu Ser Ala His Asp Pro Asn Ile
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 57
Arg Ser Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 58
Ile Val Phe Asp Ser Glu Tyr Cys Arg
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 59
Pro Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Leu
1 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Pro Leu Tyr Tyr Pro Val Asp Gly Tyr
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Arg Val Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr
 1 5

<210> 62
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 Tyr Gln Pro Val Arg Tyr Tyr Tyr Val
 1 5

<210> 63
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Val Arg Tyr Tyr Tyr Val Gln Asn Val
 1 5

<210> 64
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 Tyr Val Gln Asn Val Tyr Thr Pro Val
 1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 Glu His Val Tyr Pro Asp His Arg Leu
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Leu Val Asp Pro His Ile Glu Met Ile
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 Glu Met Ile Pro Gly Ala His Ser Ile
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 His Ser Ile Pro Ser Gly His Val Tyr
 1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 Ile Pro Ser Gly His Val Tyr Ser Leu
 1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 70
Ser Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 71
Leu Ser Glu Pro Glu Met Ala Ala Leu
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 72
Pro Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 73
Glu Met Ala Ala Leu Arg Asp Phe Val
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 74
Ala Leu Arg Asp Phe Val Ala Arg Asn
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 75
Val Ala Arg Asn Val Lys Asp Gly Leu
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 76
Thr Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 77
Ile Ala Pro Asn Gly Ala Gln Val Leu
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 78
Val Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 79
Leu Gln Val Lys Arg Gly Trp Lys Leu
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 80
Tyr Pro Arg Leu Ser Ile Pro Asn Leu
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 81
Glu Asp Gln Ala His Leu Ala Thr Tyr
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 82
His Leu Ala Thr Tyr Thr Glu Phe Val
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 83
Gly Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 84
Arg Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr
1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

Asp Gly Gln Gly Arg Ser Leu Tyr Val

1

5

<210> 86

<211> 9

<212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ser Leu Tyr Val Pro Val Met Ile Thr

1

5

<210> 87

<211> 9

<212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 87

Ile Thr Trp Asn Pro His Trp Tyr Arg

1

5

<210> 88

<211> 9

<212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 88

Ser Pro Pro Thr Pro Thr Val Thr Leu

1

5

<210> 89

<211> 9

<212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 89

Leu Ser Glu Glu Ile Asn Asn Leu Arg

1

5

<210> 90
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 90
Lys Leu Thr Glu Glu Asn Thr Thr Leu
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 91
Leu Thr Glu Glu Asn Thr Thr Leu Arg
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 92
Ile Glu Leu Arg Gly Ala Ala Ala Ala
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 93
Phe Met Ala Gln Cys Gln Ile Phe Met
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 94
Ser Met Met Thr Gly Arg Ala Ala Arg
1 5

<210> 95
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 95
 Ala Ala Arg Trp Ala Ser Ala Lys Leu
 1 5

<210> 96
 <211> 8
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 96
 Ala Lys Leu Glu Arg Ser His Tyr
 1 5

<210> 97
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 97
 Gln Gly Met Gly Ser Val Ile Asp Tyr
 1 5

<210> 98
 <211> 9
 <212> PROTEÍNA
 <213> Homo sapiens

<400> 98
 Asn Glu Pro Ala Leu Ile Asp Gln Tyr
 1 5

8x

<210> 99
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 99
Arg Arg Leu Ala Arg Ala Ala Ala Ala
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 100
Lys Pro Arg Ser Pro Pro Arg Ala Leu
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 101
Arg Met Arg Leu Thr Gln Glu Glu Lys
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PROTEÍNA
<213> Homo sapiens

<400> 102
Pro Thr Glu Pro Val Gly Gly Ala Arg
1 5

86
85

Fig. 1A

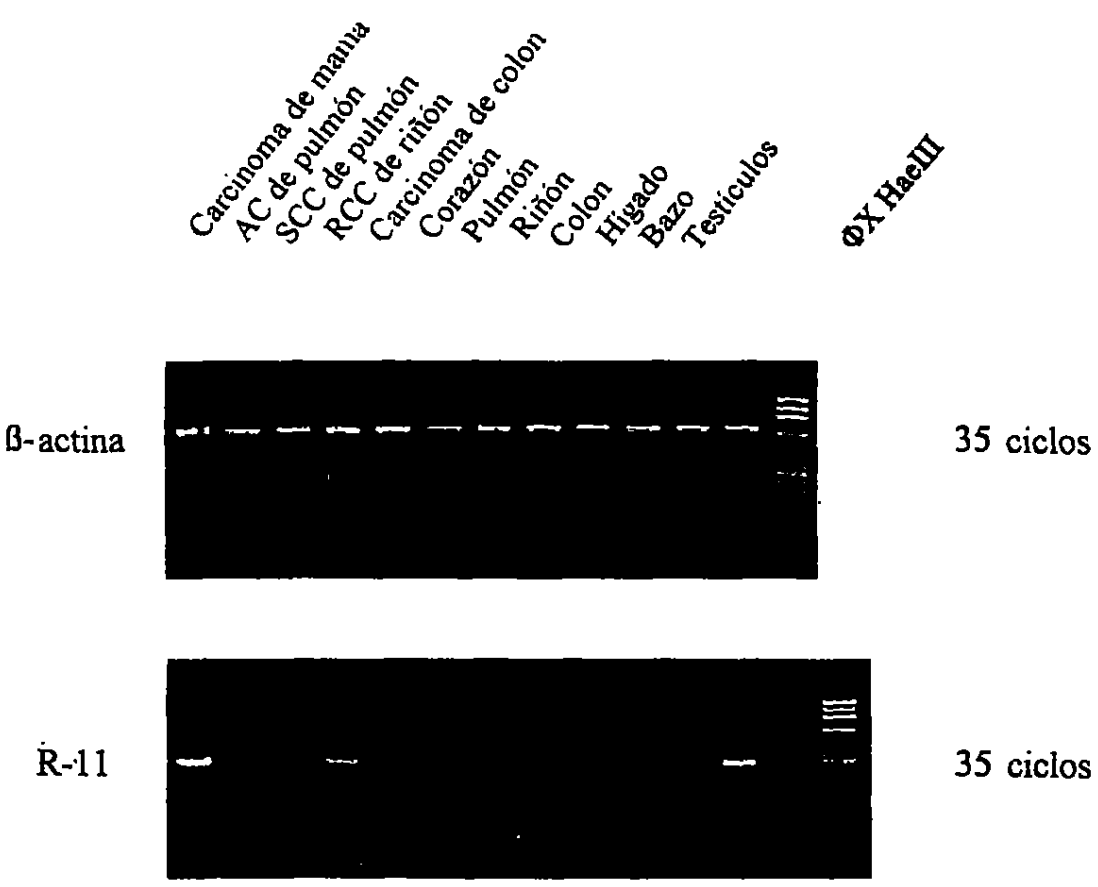
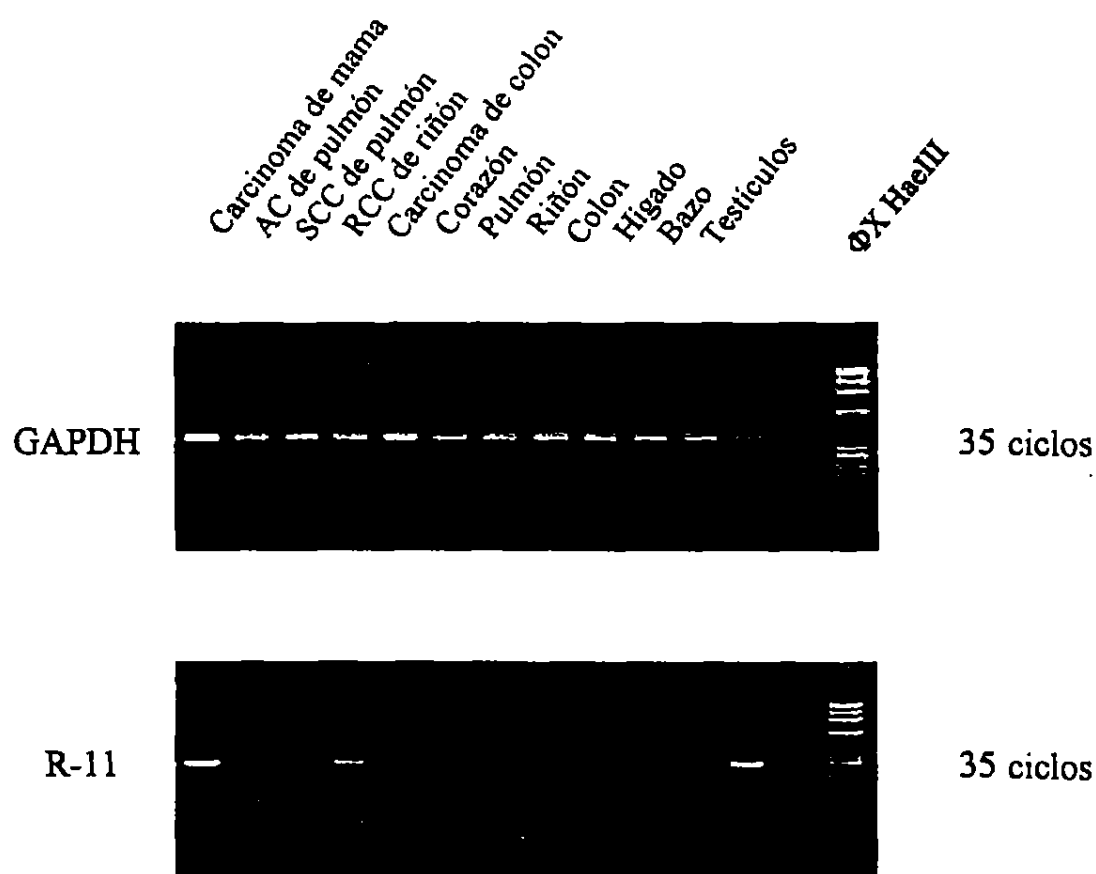
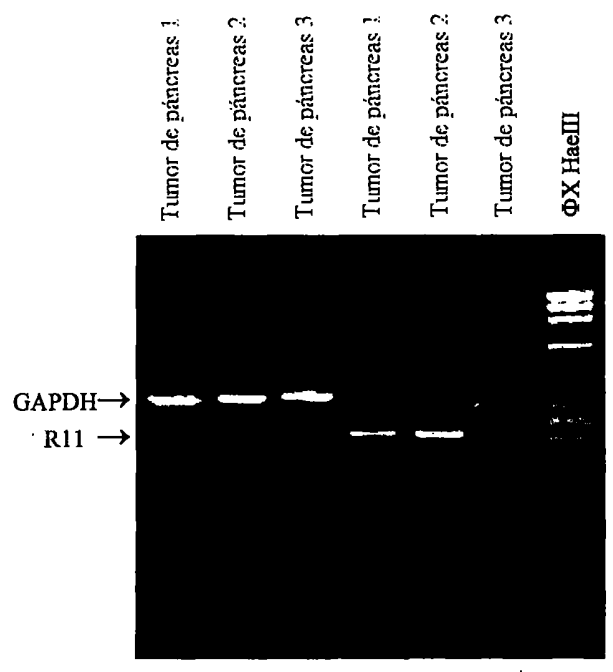


Fig. 1B



87

Fig. 2



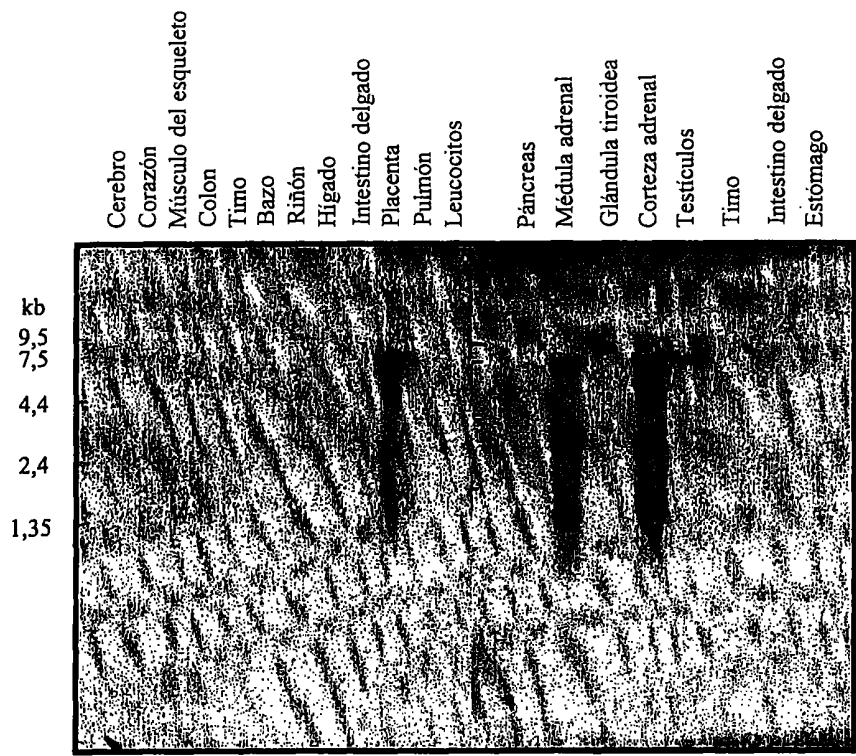
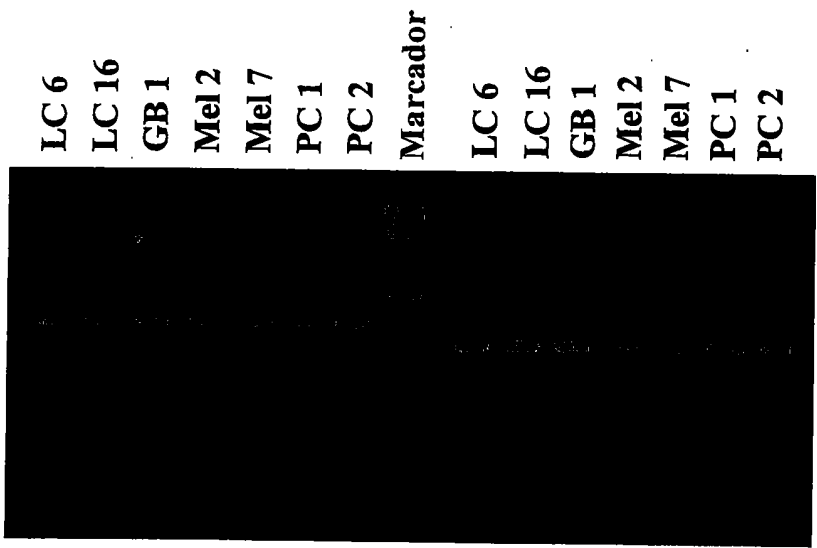


Fig. 3



LC 6
LC 16
GB 1
Mel 2
Mel 7
PC 1
PC 2
Marcador

LC 6
LC 16
GB 1
Mel 2
Mel 7
PC 1
PC 2

(35 ciclos)

Fig. 4

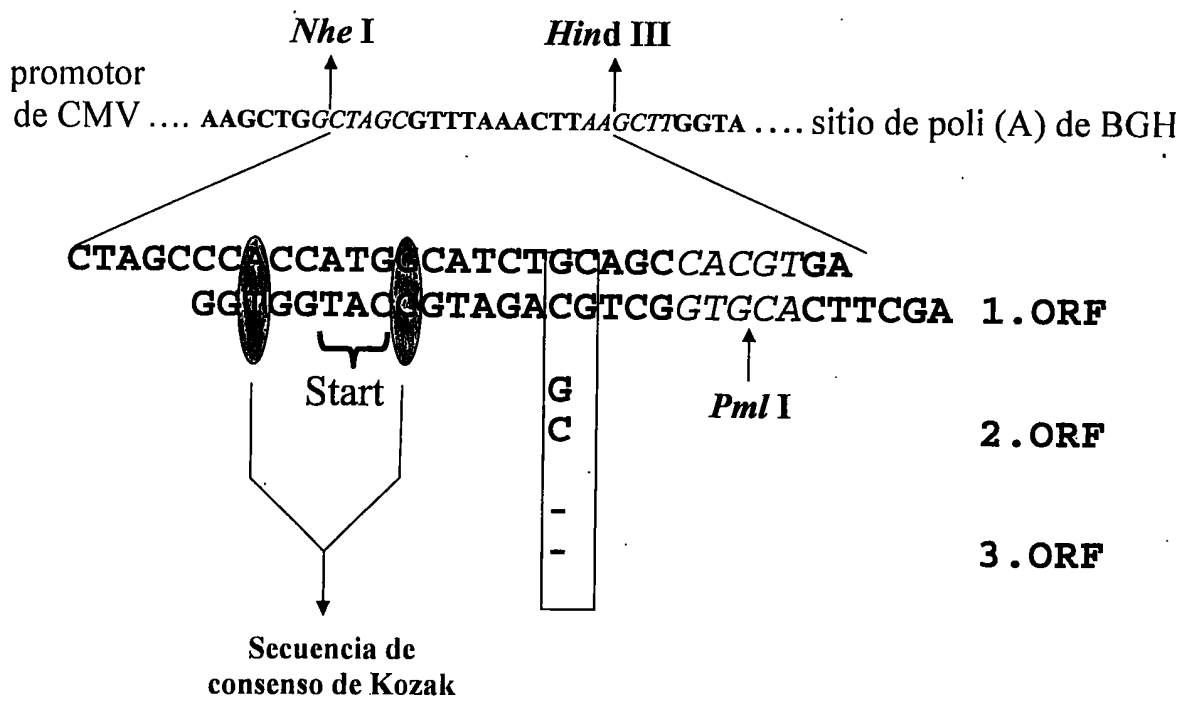


Fig. 5

80

BOGOTÁ, COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

9255

0569

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

of / domiciliado (s) en D-55216 Ingelheim am Rhein,
GERMANY

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative, or Court, cancellation, nullity, infringement, granting of trademarks, and in general the civil, penal, and administrative actions relating to these rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Ingelheim am Rhein, 12.12.1995

Given and signed this / Dado y firmado hoy

BOEHRINGER INGELHEIM

in/en INTERNATIONAL GMBH

ppq. ppq.

Dr. Dieter Laudien

Dr. Gerhard Huber

Signature

Firma

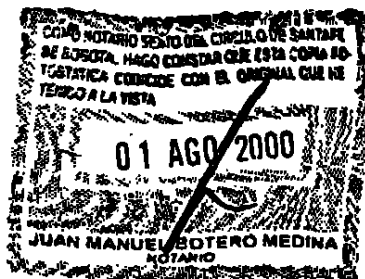
CAVELIER ABOGADOS
WPODERE-1 (MINUTA N° 12.1.1.2.5)

LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un certificado consular sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para dárselo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a consular certificate, on (1) the legal existence of the company which grants Power-of-Attorney, (2) that it is in actual exercise of company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

92
92

Vorseitige, vor mir gefertigte Namensunterschriften der Herren:

1. Dr. Dieter L a u d i e n, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55127 Mainz,.
2. Dr. Gerhard H u b e r, Rechtsanwalt, wohnhaft in 55411 Bingen,

- mir bekannt -

beglaubige ich hiermit.

Gleichzeitig bescheinige ich aufgrund heutiger Einsichtnahme in das Handelsregister des Amtsgerichts Bingen, daß die Firma Boehringer Ingelheim International GmbH mit Sitz in Ingelheim am Rhein im Handelsregister des Amtsgerichts Bingen unter HR B 1063 eingetragen ist und daß die Herren Dr. Laudien und Dr. Huber als Prokuristen gemeinschaftlich zur Vertretung der Gesellschaft berechtigt sind.

Ingelheim am Rhein, den 12. Dezember 1995/hün



[Signature]
Notariatsverweser
anstelle des Notars
Prof. Dr. Weirich in Ingelheim



- 910 E 1 -



Die Echtheit vorstehender Unterschrift des Notarassessors Dr. Peter Wirth - Notariatsverweser anstelle des Notars Prof. Dr. Weirich in Ingelheim und die Echtheit des beigedruckten Dienst - ~~scheins~~ - siegels werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß der Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Kostenberechnung:

Gebühr für Legalisation

(Wert: DM 500,-)

JVKostO. v. 28.7.1957

BGBI. I S. 851

DM 20,-

Mainz, den 13. DEZ. 1995

[Signature]

Amtsinspektor



Mainz, den dreizehnten Dezember neunzehnhundertfünfundneunzig

Der Präsident des Landgerichts

[Signature]
(Dr. Harris Paul Tüllenberg)



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
MUNICH

93

Nr. 169

El Cónsul General de Colombia

C E R T I F I C A

Que el Dr. Hanns Paul Tüttenberg -----, quién autentica la firma del signatario en el presente documento, ejercía en la fecha allí indicada las funciones de Presidente del Tribunal Regional en Mainz.

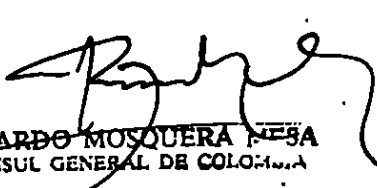
Que la firma BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH, domiciliada en 55216 Ingelheim am Rhein, Registro Mercantil Nr. HR B 1063 del Juzgado Municipal de Bingen está constituida y ejerce su objeto social de conformidad con las leyes de la República Federal de Alemania.

Que los señores Dr. DIETER LAUDIN y Dr. GERHARD HUBER

quien(es) firman el presente documento tiene (n) facultad legal suficiente para representar a la mencionada firma y otorgar poderes en su nombre.

Que ha tenido a la vista la documentación que prueba lo anterior.

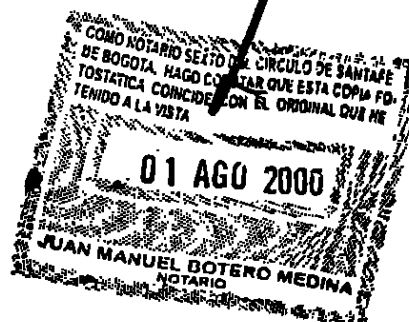
Munich, 18 de Diciembre de 1995


RICARDO MOSQUERA MESA
CONSUL GENERAL DE COLOMBIA



Derechos para la Nación	US \$	6.-
Fondo Rotatorio	US \$	100.-
Tasa consular	US \$	1 x DM 1,60 = DM 169.60

PAGADO



BOGOTA 62/2 1002421-7



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Receido

OFICINA DE REGISTRO Y
CLASIFICACION DE DOCUMENTOS

1970 ENE - 11 A 11:44

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

DELEGACION DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEITO DEL CIRCULO DE SANTA FE
DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE ESTA COMA FO-
TOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE
TENIDO A LA VISTA

01 AGO 2000

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

10045133 *NO*

94

TRADUCCION OFICIAL No. 5133

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

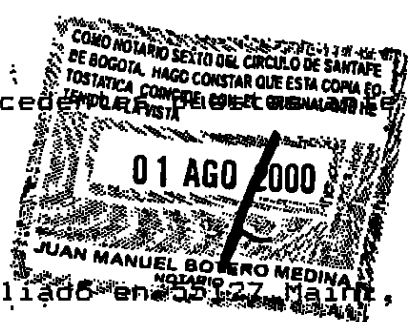
(A continuación del poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO tpa, 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555; domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia, por la BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, domiciliada en D-55216 Ingelheim am Rhein, RFA, a través de sus representantes los Srs. Dr. Dieter Laudien y Dr. Gerhard Huber:)

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
GERMAN CAVELIER
GONZALO PERDOMO
EMILIO FERRERO
VERIFICACIÓN No. 5133

Legalización

Protocolo notarial No. 2659/95 V

Certifico la autenticidad de las firmas antecede
mí por los señores:



1. Dr. Dieter Laudien, Dipl: Chim., domiciliado en 35127 Mainz,
2. Dr. Gerhard Huber, abogado, domiciliado en 55411 Bingen

a quienes conozco en persona.

95

Igualmente certifico, por haber examinado en la fecha el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen, HR B 1063, que la firma Boehringer Ingelheim International GmbH, domiciliada en Ingelheim am Rhein, está inscrita bajo el No. HR B 1063 en el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen y que los señores Dr. Laudien y Dr. Huber, en su calidad de apoderados, están facultados para representar conjuntamente a la sociedad.

Ingelheim am Rhein, 12 de diciembre de 1995/hün

Fdo.: firma ilegible

(Hilo y oblea roja en relieve:)

El notario suplente

El notario suplente - Ingelheim

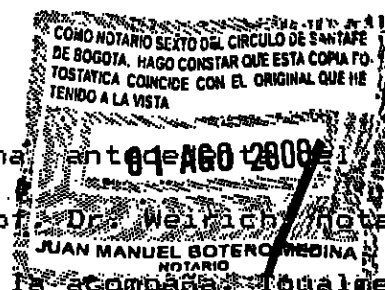
del notario de Ingelheim

Prof. Dr. Weirich

(dos sellos redondos en tinta del Tribunal Regional de Mainz)

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma de Dr. Peter Wirth, como notario suplente del Prof. Dr. Weirich, Notario de Ingelheim, y la del sello oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto oficial.



Mainz, trece de diciembre de mil novecientos
noventa y cinco

Resolución No. 559 Ministerial
F. J. J. J.
F. J. J. J.

El Presidente del Tribunal Regional

(E) Fdo.: firma ilegible

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)

Costas

Derechos de legalización

(Valor:DM 5.000,-)

JVKostO del 26 de julio 1957 :

Gacetas Oficial I Pag. 861

DM 20,--

Mainz, 13 de diciembre de 1995

Fdo.: firma ilegible

Inspector

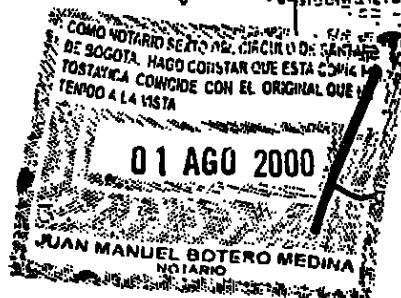
EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas antecedentes por el
Consulado de Colombia en Munich bajo el No. 189 del 18 de
diciembre de 1995, y por el Ministerio de Relaciones Exteriores
de Colombia bajo el No. 051606 del 4 de enero de 1996.
Pagados derechos y Fondo Rotatorio US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los
archivos de estas oficinas para su confrontación.

Santafé de Bogotá, 6 de enero de 1996.

LUZ ARRIAGA DE HEREDIA
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

Ministerio de Justicia



COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DE SANTAFE
DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE

Juan Manuel Rotero Medina
del 10 de Enero

C. C. _____
COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLA)
EN ESTA NOTARIA

09 ENE 1996

SANTAFE DE BOGOTA D.C.



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1996 ENE 10 A 11:33

JEFE DE REGISTRACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA
FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE
TENIDO A LA VISTA

01 AGO 2000

JUAN MANUEL ROTERO MEDINA
NOTARIO

CUYA FIRMA
DOCUMENTO
LAS FUNCIONES

TELEFAX: (57) (1) 2359830
TELEX: 45479 CAVE CO
(2317407375 CAVE UC

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 49, No. 72-35
BOGOTA 8, COLOMBIA

97
CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE
TELEFONO (57) (1) 2120100
CABLES: CAVELEYES

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

Poder conferido el: 12-12-95.

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,

GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832.

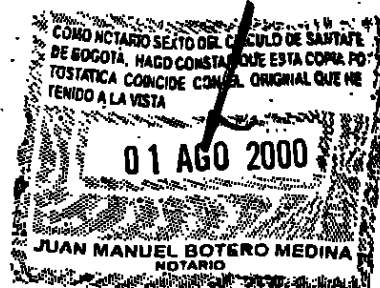
C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:

EMILIO FERRERO

T.P.A. No 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



2e-780-2

se retiraron todos 98 y 99.
de tarjetas 002016.

Se refina por los 100
extracto. Argenti.

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D. C. 11 ENE 1996

Ante M^r. PABLO XIENDEZ BARAJAS S.

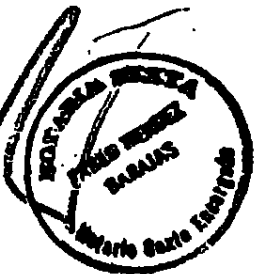
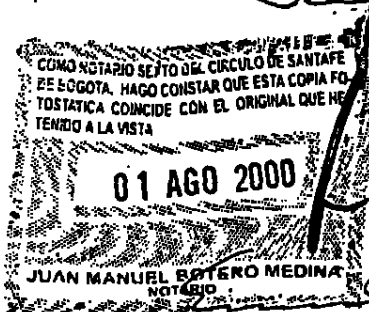
NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE BOGOTA.

Compareció(eron)

quien(es) exhibió(ron) la(s) c. c.

y la(s) Libreta(s) Militar(es)

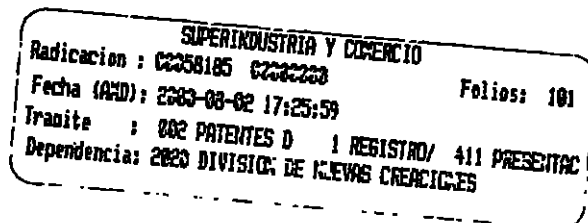
domiciliado(s) en Bogotá y declaró(aron) que la(s) firma(s) que
aparecen(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta Diligencia.



Se retiraron los

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 44,712
FECHA : JULIO 17 DE 2000



***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2855391	22,435,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

606 09255-801-023-4

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

RÉQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante | []
- Nombre e identificación del Inventor | []
- Título o nombre de la Invención | []
- Descripción 2 []
- Reivindicaciones 46 []
- Resumen 49. []
- Comprobante de Pago 101 []

COMPLETA ☒

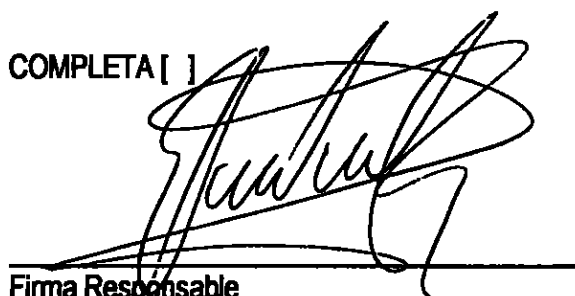
INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 62058185 62058185 Folios: 101
Fecha (ACD): 2023-08-02 17:25:59
Fecha Trámite : 602 PATENTES-D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

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

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-58185

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- | | | |
|--|--|--|
| SI ☒ | NO ☐ | NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a). |
| SI ☒ | NO ☐ | NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94). |
| SI ☒ | NO ☐ | NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000) |
| SI ☒ | NO ☐ | EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris. |
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional. |
| SI ☐ | NO ☒ | NO APLICABLE ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de Paris; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.). |
| SI ☐ | NO ☒ | CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS |

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: Deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 3 de Agosto del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.
202022

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.
PRIMER EXAMEN DE FORMA.

Radicación No. 0058185

Concepto Técnico No. 1733

Clasificación Internacional de Patentes: C07K 14/82, C12N 15/11, A61K 39/00, A61K 45/05.

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|--|--|
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del inventor (Art. 8, Art 13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del solicitante (Art. 13-a) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art. 13-e) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art. 13-b) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art. 13-c) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene los dibujos correctos (Art. 14-c junto con el literal d) del Art. 4 del (Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art. 14-c junto con el Dto. 3464 del 26 de diciembre de 1980) |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art. 13-d). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 del 94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P-104) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☐ NO ☒ | CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA. |

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA:

1. Las reivindicaciones 27 a 30 no son claras, ellas no define de manera precisa el objeto de la invención y por ende no cumple con el literal d) del artículo 13 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena donde se indica que: *"Las solicitudes para obtener patentes de invención deberán presentarse ante la oficina nacional competente y deberán contener: Una o más reivindicaciones que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente"*. Es un hecho que un antígeno, en este caso un polipéptido determinado, puede unirse o enlazarse específicamente a más de un anticuerpo, por consiguiente, decir que el anticuerpo que se desea proteger es aquel que se une de manera específica a la proteína... no es suficiente información para establecer de manera precisa cual es el objeto para el que el solicitante desea protección. Siendo que un anticuerpo es una proteína, se requiere que para lograr establecer de forma exacta cual es el objeto de la invención que dicho

anticuerpo sea definido en función de la secuencia de aminoácidos que constituyen dicha proteína o del número de depósito mediante el cual se puede acceder a dicho anticuerpo, de lo contrario se requiere que se eliminen las reivindicaciones que hagan mención del anticuerpo pues sin los datos mencionados ellas no precisan el objeto de la invención.

EXAMINADOR TÉCNICO: 202016.

Bogotá, D.C., 01 de noviembre de 2000

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-58185

AUTO 2660

DISPONE

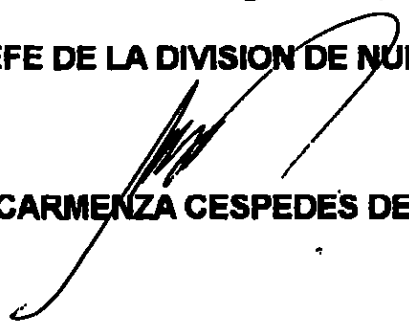
ARTICULO PRIMERO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndolo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 07 NOV. 2000

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C. 07 NOV 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ☐ NO ☐

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

202022