



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 379**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03022671 .6**

86 Fecha de presentación : **06.02.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **1411124**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Antígeno del cáncer humano de la proteína relacionada con la tirosinasa 1 y genes que lo codifican.**

30 Prioridad: **09.02.1996 US 599602**
04.10.1996 US 725736

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **The Government of the United States of America as represented by The Secretary of the Department of Health and Human Services National Institutes of Health Office of Technology Transfer, Suite 325 6011 Executive Boulevard Rockville, Maryland 20852-3804, US**

72 Inventor/es: **Wang, Rong-Fu y Rosenberg, Steven A.**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Antígeno del cáncer humano de la proteína relacionada con la tirosinasa 1 y genes que lo codifican.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los diagnósticos y productos terapéuticos para el cáncer incluyendo una vacuna contra el cáncer. Más específicamente, la invención se refiere al aislamiento y a la purificación de un nuevo péptido del cáncer y a una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo que codifica el péptido del
 10 cáncer. La invención se refiere asimismo al aislamiento y purificación de un nuevo antígeno tumoral capaz de actuar como una herramienta en el tratamiento y prevención del cáncer y a una secuencia de ADN que codifica el antígeno del cáncer. La invención se refiere además al nuevo péptido del cáncer codificado por una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo procedente del interior del gen de la proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP 1). La invención se refiere además a procedimientos de detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer y precáncer en
 15 un individuo.

Antecedentes de la invención

La transferencia adoptiva de linfocitos infiltrantes en el tumor (TIL) puede mediar la remisión tumoral en pacientes
 20 con melanoma metastásico, sugiriendo que en estas células tumorales existen antígenos de rechazo tumoral reconocidos por linfocitos T. La disponibilidad de dichos linfocitos T ha hecho posible clonar y secuenciar los genes que codifican los antígenos del melanoma humano. Los antígenos identificados hasta ahora procedentes del melanoma humano se pueden dividir en dos clases basándose en su modelo de expresión. Los antígenos de la primera clase son codificados por los genes que se expresan únicamente en el tumor y en los testículos, pero no en otros tejidos humanos
 25 normales. MAGE1, MAGE3, GAGE y BAGE son ejemplos de esta clase. La segunda clase de antígenos representa los antígenos con diferenciación codificados por los genes que se expresan únicamente en melanocitos, melanomas y retina normal. MART-1/Melan-A, gp100 y tirosina son ejemplos de esta clase. Todos estos antígenos son autoproteínas no mutadas. Sin embargo, varios antígenos mutados fueron también identificados al ser reconocidos por los linfocitos T, incluyendo CDK 4, catenina-B y Mum-1. La identificación de los epítomos antigénicos reconocidos por los linfocitos
 30 T procedentes de los correspondientes productos del gen es importante no solamente para comprender el mecanismo de la respuesta inmunitaria a los autoantígenos, sino también para desarrollar nuevas estrategias inmunoterapéuticas eficaces con estos antígenos o péptidos sintéticos para el tratamiento de pacientes con cáncer.

Los estudios anteriores demostraron que la infusión de TIL586 más IL-2 en el paciente autólogo con melanoma
 35 produjeron la remisión objetiva de la metástasis. Más recientemente, se clonó el gen, de la proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP-1 o gp75) que codifica el antígeno tumoral reconocido por TIL586 junto con HLA-A31. El producto del gen, gp75, se identificó al principio, de forma ventajosa, como un antígeno reconocido por los anticuerpos de IgG en el suero de un paciente con melanoma metastásico. Se observó que el gen se expresaba solamente en el melanoma, las líneas celulares normales de melanocito y la retina, pero no en otros tejidos normales probados. Por consiguiente,
 40 este gen es un elemento de la segunda clase de antígenos que incluyen a MART-1/Melan-A, gp100 y tirosinasa.

En la técnica, ha sido difícil identificar un epítipo en una célula cancerosa que sería útil como inmunógeno o
 vacuna para proteger a un paciente de desarrollar el cáncer. La presente invención es la identificación de un péptido
 45 del cáncer y del epítipo antigénico del cáncer en el péptido codificado a partir de una secuencia con marco de lectura abierto alternativo en el gen de TRP-1 que es reconocido específicamente por los linfocitos T. El péptido del cáncer de la invención es útil como inmunógeno y vacuna para inhibir y prevenir el cáncer en un mamífero.

Sumario de la invención

50 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo péptido y fragmentos del mismo reconocidos como antígenos del cáncer por los linfocitos T.

El péptido del cáncer de la presente invención y el fragmento antigénico del epítipo del cáncer están codificados
 55 por una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo de otro gen aparte de la secuencia del ADN con marco de lectura abierto utilizado para codificar una proteína o péptido normal del mismo gen. Un gen comprendido dentro de este ámbito es el gen de TRP-1. (documento WO 91/14775).

Otro aspecto de la invención es un antígeno tumoral codificado por una secuencia de ADN con marco de lectura
 60 abierto alternativo de otro gen distinto de la secuencia de ADN con marco de lectura abierto que codifica una proteína o péptido normal del mismo gen. Un gen comprendido dentro de este ámbito es el gen de TRP-1.

TRP-2 es un miembro de la familia del gen relacionado con la tirosinasa. TRP-2 está identificado como un nuevo
 y potente antígeno tumoral capaz de provocar que los linfocitos T produzcan una respuesta inmunitaria.

65 Un aspecto de la invención son los péptidos del cáncer codificados por un marco de lectura abierto alternativo del gen de TRP-1 o sus variantes, que son útiles como vacunas contra el cáncer capaces de proteger al receptor del desarrollo del cáncer. La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de administración de la vacuna contra el cáncer en una cantidad eficaz para prevenir cánceres.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un péptido del cáncer o un epítipo antigénico del cáncer del mismo, solo o en combinación con una o más moléculas inmunoestimulantes. Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende péptidos codificados por un marco de lectura abierto alternativo del gen TRP1, o sus combinaciones que estimulan los linfocitos T para producir una respuesta inmunógena contra los tumores y cánceres. El péptido del cáncer o su epítipo antigénico del cáncer se pueden proporcionar como inmunógeno o como vacuna para la prevención o el tratamiento del cáncer. La composición farmacéutica es útil en los procedimientos de tratamiento o de prevención del cáncer en un mamífero. En el procedimiento de tratamiento, la composición farmacéutica se administra a un mamífero en una cantidad eficaz para prevenir o inhibir el cáncer en un mamífero.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento de generación de péptidos del cáncer y del epítipo antigénico del cáncer en el péptido por traducción de una secuencia de ADN con marco alternativo de lectura abierto a partir de un gen TRP-1.

Todavía otro objeto de la invención es un procedimiento de detección e identificación del producto génico del péptido del cáncer y sus fragmentos traducidos a partir de una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo procedente de un gen TRP-1.

Un aspecto adicional de la invención es una secuencia de ADN o ARN con marco de lectura abierto alternativo de un gen TRP-1 que codifica un péptido del cáncer o un fragmento del mismo y la utilización de la secuencia de ADN o ARN en los procedimientos de producción del péptido del cáncer o sus fragmentos. La invención proporciona además oligonucleótidos de la secuencia de ADN o ARN alternativa con marco de lectura abierto del gen TRP-1 para su utilización como sondas o cebadores.

La presente invención proporciona además vectores que comprenden una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo del gen TRP-1 que codifica un péptido del cáncer o sus fragmentos solo o en combinación con una segunda secuencia de ADN que codifica por lo menos una molécula inmunoestimulante. La secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo procede del gen de TRP-1 o de una variante del mismo.

La invención también proporciona células hésped transfectadas o transducidas con un vector que comprende una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo del gen TRP-1 que codifica un péptido o los fragmentos del mismo solo o en combinación con una segunda secuencia de ADN que codifica por lo menos una molécula inmunoestimulante.

Los vectores y las células hésped pueden servir como vacunas en las que la expresión de un antígeno tumoral o los péptidos del cáncer producen la estimulación de los linfocitos T específicos del antígeno tumoral en un mamífero inmunizado con la vacuna.

Los vectores y las células hésped pueden servir como vacunas en las que la expresión de un péptido del cáncer o de sus fragmentos producen la estimulación de los linfocitos T específicos del péptido del cáncer en un mamífero inmunizado con la vacuna.

Otro objeto de la invención todavía consiste en proporcionar un procedimiento para diagnosticar células y tejidos humanos preneoplásicos y neoplásicos.

La invención proporciona un procedimiento de diagnóstico del cáncer o precáncer en un mamífero mediante detección de un péptido del cáncer o de fragmentos del mismo codificados por una secuencia de ácido nucleico alternativa con marco de lectura de un gen TRP-1 en el que el péptido del cáncer o una porción del mismo es reconocido por los linfocitos T. Una secuencia de ácido nucleico alternativa con marco de lectura abierto procede del gen de TRP-1 o de una variante del mismo.

Todavía otro objeto de la invención consiste en proporcionar un procedimiento para diagnosticar células y tejidos humanos preneoplásicos y neoplásicos. Según la invención, el procedimiento comprende células aislantes, tejidos o extractos de los mismos de un ser humano y que detectan la secuencia alternativa de ADN con marco de lectura abierto, la secuencia de ARN o un fragmento de la misma que codifica un péptido del cáncer o que detectan el péptido del cáncer o los fragmentos del mismo expresados por la secuencia alternativa de ADN con marco de lectura abierto o la secuencia de ARN del gen TRP-1, en el que la detección de/o el aumento de la secuencia alternativa de ADN con marco de lectura abierto, la secuencia de ARN o el producto de expresión es indicador de preneoplasia y neoplasia.

Todavía otro objeto de la invención consiste en proporcionar un animal transgénico que ha incorporado en su genoma una o más copias de la secuencia de ADN alternativa con marco de lectura abierto del gen TRP-1 que codifica un péptido del cáncer o un fragmento del mismo. Una secuencia ácido nucleico alternativa con marco de lectura procede del gen de TRP-1 o de una variante del mismo. La incorporación de la secuencia de ADN alternativa con marco de lectura abierto produce sobreexpresión o expresión de múltiples formas o variantes del péptido del cáncer. Tales animales transgénicos son útiles para el cribado de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer.

Todavía otro objeto de la invención consiste en proporcionar un animal transgénico que ha incorporado en su genoma una o más copias del antígeno tumoral del mismo de la presente invención. Tales animales transgénicos son útiles para el cribado de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento del cáncer.

La invención abarca asimismo oligonucleótidos con cadena complementaria que direccionan específicamente y se unen a la secuencia ácido nucleico alternativa con marco de lectura abierto del gen TRP-1 e inhiben la expresión del péptido del cáncer o del antígeno tumoral sin afectar desfavorablemente la expresión de la proteína normal del mismo gen.

Todavía otro aspecto de la invención son los anticuerpos monoclonales y policlonales reactivos con el péptido del cáncer y con el epítipo antigénico del cáncer del mismo, incluyendo el péptido del cáncer codificado por un marco de lectura abierto alternativo de este gen TRP-1 para su utilización en las pruebas de diagnóstico y de detección. Los anticuerpos monoclonales y policlonales se pueden proporcionar en forma de un equipo solo, o junto con otros reactivos utilizados frecuentemente en las pruebas de diagnóstico y detección.

Breve descripción de las figuras

Estos y otros objetivos, características y muchas ventajas asociadas de la invención se comprenderán mejor tras una lectura de la siguiente descripción detallada considerada juntamente con los dibujos adjuntos a esta memoria:

Las Fig. 1A y 1B presentan la situación de la secuencia del nucleótido del gp75 que codifica los péptidos antigénicos reconocidos por TIL586.

La Fig. 1A presenta el ADNc completo que comprende el marco de lectura abierto de gp75 de 1584 bp. Los nucleótidos se numeran a partir del codón de iniciación que traduce una proteína constituida por una secuencia principal y la gp75 madura. pADNc776 es una parte del ADNc de gp75 que carece de la zona de codificación de los 246 primeros nucleótidos y se aisló de una biblioteca de ADNc utilizando un análisis basado en la capacidad de TIL586 para estimular la secreción de GM-CSF al transfectar conjuntamente COS-7 junto con el gen HLA-A31. Se preparó una serie de construcciones de delección y fragmentos de ADN por PCR. pD776A es un derivado de pADNc776 después de la digestión con la enzima de restricción ApaI.

La Fig. 1B presenta la liberación de GM-CSF por TIL586. Se midió la secreción de GM-CSF por TIL586 después de ser cultivado conjuntamente con COS-7 transfectado conjuntamente con fragmentos de ADN mostrados en la Fig. 1A y con el gen de HLA-A31. Las células estimulantes de referencia incluyen 586 mel, 397 mel/A31⁺, COS-7 solo y COS-7 transfectado bien la HLA-A31 o el ADNc del pADNc776.

La Fig. 2 presenta el nucleótido, la secuencia de aminoácidos y los marcos de lectura abiertos del gen gp75. El nucleótido parcial y las secuencias de aminoácidos de los primeros 157 aminoácidos se presentaron a partir del codón de inicio para la traducción de ORF1 (gp75). El fragmento de ADN que confiere la capacidad para estimular la liberación de GM-CSF de TIL586 está subrayado. Dos supuestos codones de inicio, ATG (254-256) y ATG (294-296), están en negrita y pueden producir la traducción de ORF2 y ORF3, respectivamente. La secuencia del péptido reconocida por TIL586 de ORF3 está en negrita y subrayada.

La Fig. 3A y 3B presenta un péptido antigénico y la traducción de un marco de lectura abierto alternativo.

La Fig. 3A presenta la situación y la longitud de los fragmentos de PCR amplificados por PCR. Se obtuvieron fragmentos de ADN mediante amplificación por PCR y se clonaron a continuación en el vector de expresión pCR3. La sustitución de ATG en las posiciones 294 a 296 por ATC se realizó tal como se describe en Material y procedimientos.

La Fig. 3B presenta la prueba de los fragmentos de ADN y de las construcciones de mutación para estimular la liberación de citosina de TIL586. La prueba de liberación de GM-CSF se realizó como en la Fig. 1.

La Fig. 4A a 4C presenta la caracterización del péptido antigénico reconocido por TIL586.

La Fig. 4A presenta la liberación de GM-CSF por TIL586 restringida por HLA-A31 cuando se incubó conjuntamente con varios estimulantes. Se realizó la transfección y el análisis de citocina como en la Fig. 1A y B. Se incluyeron 586 mel y 397 mel como referencias positiva y negativa para la reactividad de TIL586. Se incubó el péptido ORF3P con 586EBV (A31⁺) y células T2 (sin A31) a una concentración de 1 µg/ml durante 90 min. La estimulación de la secreción de GM-CSF por TIL586 aumentó de forma significativa cuando se incubó conjuntamente con células 586EBV autólogas y 1510EBV (A31⁺) alógenas pulsadas con péptido ORF3P, pero no cuando se incubó conjuntamente con células 586EBV solo o con T2 (sin A31) cargadas con un péptido ORF3P.

La Fig. 4B presenta la lisis citotóxica por TIL586 de las células objetivo. Se utilizaron 586 mel (—■—) y 397 mel (—□—) como referencias positiva y negativa, respectivamente. Se incubaron linfocitos B de 586EBV con ORF3P (pep) (—▲—), con un péptido improcedente (ipep) (—●—) sin péptido (—Δ—) y células T2 pulsadas con ORF3P (—○—) como se indica. Después de la incubación, se añadió TIL 586 y se mezcló con las células objetivo. Se midió la actividad citolítica de TIL586 en una prueba de liberación de cromo de 4h.

La Fig. 4C presenta la valoración de la concentración del péptido para sensibilizar las células objetivo para la lisis por TIL586. Se incubaron células 586EBV por separado con diluciones en serie de ORF3P (pep) (—▲—) o con péptidos improcedentes (ipep) (—●—) y células T2 con el péptido ORF3P (—○—) durante 90 min. Se evaluó la actividad citolítica de TIL586 en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4h en una proporción efector:objetivo (E:T) de 40:1.

Las Figs. 5A y 5B presentan la inhibición de la lisis de las células objetivo marcadas con ^{51}Cr por las células 586EBV no marcadas cargadas con el péptido ORF3P.

La Fig. 5A presenta las células 586 mel marcadas con cromo durante 90 min como un objetivo “caliente”. Se utilizaron células EBV586 pulsadas con ORF3P (—▲—), con péptido improcedente (—Δ—) y células T2 cargadas con ORF3P (—□—) como células objetivo “frías”. Después del lavado, se hizo de nuevo un recuento de las células objetivo “calientes” y “frías” y se mezclaron en la proporción “fría”/“caliente” de 1:1, 5:1, 10:1 y 20:1. Se añadió TIL586 en una proporción efector:objetivo “caliente” (E:T) de 20:1. Se midió la liberación de cromo después de 4 h de incubación.

La Fig. 5B presenta la lisis de 624 mel marcada con ^{51}Cr (objetivo “caliente”) por TIL1200 que reconoció gp100 no fue inhibida por las células 586EBV pulsadas con ORF3P (—▲—) en comparación con las células 586EBV pulsadas con un péptido improcedente (—Δ—). Las células objetivo “frías” y “calientes” se mezclaron en las proporciones indicadas. Se añadió TIL1200 en una proporción efector:objetivo “caliente” (E:T) de 30:1. Se evaluó la actividad citolítica de TIL1200 en una prueba de liberación de ^{51}Cr de 4h.

Las Figuras 6A a 6D presentan el reconocimiento de los clones de los linfocitos T del péptido antigénico procedentes de la línea celular TIL586. Se generaron clones de linfocitos T procedentes de la línea celular TIL586. Los linfocitos B de 586EBV se pulsaron con el péptido ORF3P o con un péptido improcedente. Se añadió clon del linfocito T o de células TIL586 y se incubaron conjuntamente. Para tumores con 586 mel, 397 mel/A31⁺ y melanocitos NHEM680, se incubaron 1×10^5 células por pocillo con 1×10^5 células para clones de linfocitos T, TIL586-C1 (Fig. 6A), TIL586-C4 (Fig. 6B) y TIL586-C6 (Fig. 6C) o TIL586 (Fig. 6D) durante 18 a 24 h, respectivamente. Se realizó el análisis de GM-CSF tal como se describe en la Fig. 1B.

Fig. 7. Reconocimiento de varias células objetivo y del péptido antigénico por clones de CTL procedentes de TIL586. Se generaron clones de linfocitos T por dilución limitada (1 célula por pocillo) de la línea celular TIL586 y se expandieron además en un medio AIM-V conteniendo 6000 IU/ml de IL-2. Se midió la secreción de GM-CSF por el clon 586TIL-C1 de CTL y por el clon 4 después del cultivo conjunto con la línea celular de melanocitos normales (HLA-A31+), con linfocitos B de 586EBV pulsados con el péptido ORF3P o con un péptido improcedente, células 397 mel o 586 mel.

Figs. 11A a 11C. Caracterización del péptido antigénico reconocido por el clon 4 de CTL. Figura 11 (A). Liberación de GM-CSF por linfocitos T a diferentes concentraciones de péptido. Se pulsaron 586EBV (A31+) con el péptido TRP₁₉₇₋₂₀₅ (—▲—) y se pulsaron linfocitos T2 (sin A31) con el TRP₁₉₇₋₂₀₅ (—●—) a varias concentraciones de péptido durante 90 min. Se pulsó ORF3P como péptido de referencia en linfocitos B de 586EBV (—Δ—). Se determinó la liberación de GM-CSF por el clon 4 de CTL después de incubación conjuntamente con linfocitos B de 586EBV pulsados con TRP₁₉₇₋₂₀₅ y ORF3P y linfocitos T2 pulsados con TRP₁₉₇₋₂₀₅.

Figura 11 (B). Sensibilización de células objetivo para la lisis por el clon 4 de CTL a diferentes concentraciones de péptido. Se incubaron linfocitos B de 586EBV con TRP₁₉₇₋₂₀₅ (—▲—), un péptido improcedente ORF3P (—Δ—) y linfocitos T2 pulsados con TRP₁₉₇₋₂₀₅ (—●—) a varias concentraciones de péptido. Después de la incubación del péptido, se marcaron las células objetivo durante 30 min. Después de los lavados, se midió la actividad citolítica del clon 4 de CTL a una proporción de E:T de 40:1 después de una incubación de 4 h de los linfocitos T con células objetivo.

Figura 11 (C). Lisis de células objetivo por el clon 4 de CTL a diferentes proporciones de E:T. Se incubaron por separado células 586EBV con TRP₁₉₇₋₂₀₅ (—▲—), o con péptidos improcedentes ORF3P (—Δ—) y se incubaron linfocitos T2 objetivo con péptido TRP₁₉₇₋₂₀₅ (—●—) durante 90 min. Se utilizaron 586 mel (—□—) y 397 mel (—■—) como referencias positiva y negativa, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca péptidos del cáncer, antígenos tumorales y fragmentos, derivados o variantes de los mismos que son reconocidos inmunológicamente por los linfocitos T del sistema inmunitario. La presente invención abarca además el/los epítipo(s) antigénico(s) del cáncer que están contenidos en los péptidos del cáncer o en el antígeno tumoral. El epítipo antigénico del cáncer produce específicamente una respuesta inmunitaria celular mediada por interacción con los linfocitos T del sistema inmunitario. Esta interacción entre el epítipo antigénico del cáncer y los linfocitos T da lugar a que los linfocitos T respondan contra, y previene, elimina o reduce en cáncer en los mamíferos, incluyendo el hombre.

En una forma de realización, los péptidos del cáncer y los epítopos antigénicos del cáncer dentro de los péptidos del cáncer de la presente invención se distinguen de las proteínas o péptidos normales en que los péptidos del cáncer son codificados por un marco de lectura abierto alternativo de un gen TRP-1. El péptido del cáncer y sus

fragmentos están ausentes de forma característica de o presentes en concentraciones muy bajas de células normales y en concentraciones altas están presentes células precancerosas y cancerosas. La expresión del péptido del cáncer en grandes concentraciones está correlacionada con la transformación de células normales en células precancerosas o cancerosas.

Los péptidos del cáncer de la presente invención forman parte de, o proceden de, cánceres que incluyen pero no se limitan a melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer pulmonar, cáncer de hígado, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas tales como el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer pancreático y similares.

El término melanoma incluye, pero no se limita a, melanomas, melanomas metastásicos, melanomas derivados bien de melanocitos o de melanocitos relacionados con nevocitos, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanomas, melanoma *in situ*, melanoma que se propaga en superficie, melanoma nodular, melanoma de lentigo maligno, melanoma acrolentiginoso, melanoma invasor o lunar atípico familiar y síndrome de melanoma (FAM-M).

De particular interés son los péptidos, fragmentos o derivados del cáncer de los mismos reconocidos por CTL autólogos en pacientes con cáncer, en particular melanoma. De mayor interés son los péptidos, fragmentos o derivados de los mismos del cáncer reconocidos por los CTL restringidos por MHC, en particular los CTL restringidos por MHC de clase I.

El “antígeno tumoral” de la presente invención abarca la proteína del cáncer o del tumor y cualquier fragmento o péptido de la proteína del cáncer o el tumor capaz de producir una respuesta antitumoral en mamíferos.

Tal como se utiliza en la presente memoria el término “péptidos del cáncer” abarca cualquier epítipo o fragmento de proteína del cáncer o del tumor, que actúa como antígeno tumoral.

Tal como se utiliza en la presente memoria el término “fragmento” significa cualquier segmento de una proteína o gen, que tiene por lo menos 5 ó 6 aminoácidos en el caso de un fragmento de proteína y por lo menos 15 a 18 nucleótidos en el caso de un gen.

En una forma de realización, los péptidos del cáncer de la presente invención proceden de la expresión de una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo de un gen normal. En lugar del producto del gen normal que se expresa, un péptido del cáncer que es capaz de ser reconocido inmunológicamente por linfocitos T se expresa de un modo restringido por MHC. Los linfocitos T restringidos por MHC son útiles en la identificación del producto génico del marco de lectura abierto alternativo asociado al cáncer y al precáncer.

En una forma de realización, un péptido, fragmento o su derivado del cáncer de la presente invención comprende el epítipo antigénico del cáncer inmunológicamente reconocido por los linfocitos infiltrantes en el tumor (TIL) procedentes de un tumor del cáncer de un mamífero. De particular interés son los epítopos antigénicos del cáncer reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno del cáncer (CD 8⁺).

En una forma de realización de la presente invención, el péptido del cáncer comprende aproximadamente 24 aminoácidos y se expresa mediante la secuencia de 3 ADN con marco de lectura abierto alternativo del mismo gen que codifica la proteína 1 relacionada con la tirosinasa como se representa en la Figura 2 o de sus homólogos o variantes.

En una forma de realización, el péptido del cáncer de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos:

MXaaLQRQFLRTQLWDVPSWLER SCL, (SEC ID n°: 7) y fragmentos o derivados de los mismos, en los que Xaa = Ser o Ala. Están abarcados también en el ámbito de la invención los péptidos del cáncer o los fragmentos de los mismos que comparten la homología de secuencia parcial con SEC ID n°: 6. Homología de secuencia parcial de aminoácidos significa un péptido que tiene por lo menos el 85% de la homología de secuencia con SEC ID n°: 6, preferentemente por lo menos el 95% de la homología de secuencia o más y tiene la función biológica de estimular los linfocitos T específicos del antígeno del cáncer.

En una forma de realización de la presente invención, el péptido del cáncer puede estar representado por la fórmula:

Met Xaa Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg (SEC ID n°: 8) y fragmentos y derivados de la misma en la que Xaa = Ser o Ala.

En otra forma de realización el péptido del cáncer de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos:

MSLQRQFLR (SEC ID n°: 9) y fragmentos y derivados de la misma.

El antígeno tumoral de la presente invención está presente en concentraciones significativamente más bajas en la mayoría de las células normales que las concentraciones elevadas halladas en las células precancerosas y cancerosas. La expresión elevada del antígeno tumoral se correlaciona con la transformación de las células normales en una célula precancerosa o cancerosa. TRP-2 está situado en el cromosoma 13 humano y se ha demostrado que es un miembro de la familia del gen relacionado con la tirosinasa y comparte una identidad de la secuencia de aminoácidos del 40 al 45% con la tirosinasa y gp75/TRP-1 (Yokoyama *et al.*, (1994); Bouchard, *et al.*, (1994)). TRP-2 codifica una proteína con 519 aminoácidos y se ha demostrado que presenta una actividad de DOPAcromo tautomerasa implicada en la síntesis de melanina (Bouchard *et al.* (1994)).

La presente invención se refiere a variantes funcionalmente equivalentes de los péptidos del cáncer codificados por un marco de lectura abierto alternativo del gen TRP-1. Las “variantes funcionalmente equivalentes” incluyen los péptidos con homología parcial de secuencia, los péptidos que presentan uno o más cambios de aminoácidos conservadores y/o no conservadores específicos, conjugados de péptidos, proteínas híbridas, proteínas de fusión y ácidos nucleicos de péptidos.

Los péptidos del cáncer, el antígeno tumoral y sus epítopos antigénicos del cáncer se pueden purificar y aislar de sus fuentes naturales, como por ejemplo de sus cepas clínicas primarias, de las líneas celulares y similares. El péptido del cáncer y sus fragmentos son por lo menos del 90% de pureza, preferentemente del 95% de pureza y tan puros como el 100%. Los péptidos del cáncer y sus epítopos antigénicos se pueden obtener también por síntesis química o por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Las técnicas para la síntesis química se describen en J.M. Steward y J.D. Young, “Solid Phase Peptide Synthesis”, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1969; M. Bodansky *et al.* “Peptide Synthesis”, John Wiley & Sons, segunda edición, 1976 y J. Meienhofer, “Hormonal Proteins and Peptides”, vol. 2, pág. 46, Academic Press, Nueva York, 1983 y E. Schroder y K. Kubke, “The Peptides”, vol. 1, Academic Press, Nueva York, 1965.

Los péptidos del cáncer y sus epítopos antigénicos del cáncer se pueden formular con excipientes farmacéuticamente aceptables en composiciones farmacéuticas por los procedimientos conocidos en la técnica. La composición es útil como vacuna para prevenir o tratar el cáncer. La composición puede comprender además por lo menos una molécula inmunoestimulante. Las moléculas inmunoestimulantes que se han de utilizar junto con el péptido del cáncer o su fragmento para estimular las respuestas de los linfocitos T específicos del antígeno estimulante incluyen pero no se limitan a uno o más moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC), tales como las moléculas de clase I y clase II, preferentemente una molécula de clase I. La composición puede comprender además otras moléculas estimulantes incluyendo B7.1, B7.2, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, CD72 y similares y citocinas que incluyen pero no se limitan a IL-1 a IL-15, TNF α , IFN γ , RANTES, G-CSF, M-CSF, IFN α , CTAP III, ENA-78, GRO, I-309, PF-4, IP-10, LD-78, MGSA, MIP-1 α , MIP-1 β o sus combinaciones y similares para inmunopotenciación.

La molécula estimulante se puede suministrar como una entidad físicamente independiente o se puede suministrar en la membrana de un antígeno que se presenta en células tales como linfocitos B, macrófagos o células dendríticas, en la membrana de un liposoma o se expresan en la superficie de una célula transducida o transfectada. Las secuencias de ADN de las moléculas inmunoestimulantes de MHC están disponibles en GenBank y similares.

Los péptidos del cáncer, antígenos tumorales y sus epítopos antigénicos del cáncer son útiles en los procedimientos de prevención o tratamiento del cáncer y son útiles en el análisis del diagnóstico para detectar el cáncer o el precáncer en un mamífero, incluyendo el hombre. Los péptidos del cáncer o sus fragmentos pueden estar en forma de derivados a los que se unen otros constituyentes tales como radiomarcadores, biotina y fluoresceína. También se puede unir a los péptidos del cáncer o a sus fragmentos un agente de direccionamiento al antígeno tumoral, permitiendo el direccionamiento específico a un órgano, tumor o a tipos celulares específicos. Dichos agentes de direccionamiento pueden ser hormonas, citocinas, receptores celulares y similares. El péptido del cáncer, antígeno tumoral y sus fragmentos se pueden preparar en forma de botiquín, solo en combinación con otros reactivos.

Otro aspecto de la invención es una vacuna útil para producir inmunidad mediada por células específicas del tumor contra el cáncer.

Los planteamientos para la inmunoterapia del cáncer se pueden dividir en categorías activas o pasivas. La inmunoterapia activa implica la inmunización directa de los pacientes de cáncer con antígenos del cáncer en un intento de reforzar las respuestas inmunitarias contra el tumor. La inmunoterapia pasiva se refiere a la administración de reactivos inmunitarios, tales como células o anticuerpos inmunes con reactividad antitumoral con objeto de mediar directamente en las respuestas antitumorales.

La mayoría de los intentos anteriores en la inmunoterapia activa utilizó células cancerosas íntegras o extractos de células cancerosas con la expectativa de que estos materiales contuvieran antígenos tumorales en cantidad y forma capaces de estimular respuestas inmunitarias. La identificación molecular de los antígenos del cáncer ha abierto, sin embargo, nuevas posibilidades de desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento del cáncer humano. Un resumen de algunas de estos planteamientos se presenta en la Tabla 1.

TABLA 1

Terapias para el cáncer basadas en la identificación molecular de antígenos del cáncer

1. Inmunoterapia activa con:
 - a. Péptidos inmunodominantes
 - 1) solos
 - 2) combinados con adyuvantes
 - 3) unidos a péptidos, lípidos o liposomas cooperadores
 - 4) pulsados en antígenos presentes en células
 - b. Péptidos inmunodominantes con sustituciones de aminoácidos para aumentar la unión a moléculas MHC
 - c. Proteínas solas o combinadas con adyuvantes
 - d. ADN “desnudo” que codifica antígenos del cáncer
 - 1) “cañón génico” para inyección intradérmica
 - 2) inyección intramuscular
 - 3) unido a lípidos
 - e. Virus recombinantes tales como vacunas, viruela aviar o adenovirus que codifican
 - 1) antígenos del cáncer solos
 - 2) antígenos del cáncer más genes que codifican citocinas, moléculas coestimulantes u otros genes para potenciar la respuesta inmunitaria
 - f. Bacterias recombinantes tales como BCG, *Salmonella* o *Listeria* que codifican antígenos del cáncer solos o en combinación con moléculas inmunoestimulantes
2. Inmunoterapia activa (anterior) seguida de administración de citocinas inmunoestimulantes
 1. IL-2
 2. IL-6
 3. IL-10
 4. IL-12
 5. IL-15 y similares.
3. Inmunoterapia pasiva con linfocitos antitumorales producidos por sensibilización *in vitro* de TIL o PBL para
 1. péptidos inmunodominantes pulsados en antígenos presentes en células (producen células CD8)
 2. proteínas antigénicas incubadas conjuntamente con antígenos presentes en células (antígeno exógeno presente en el paso para producir células CD4).

La inserción del gen que codifica antígenos del cáncer en sistemas de expresión de gran eficacia tales como *E. coli*, levaduras o baculovirus y similares proporciona la oportunidad de obtener grandes cantidades de antígeno tumoral purificado para su utilización en inmunización. Como alternativa, los péptidos inmunodominantes de estos antígenos tumorales podrían ser sintetizados *in vitro* fácilmente y purificados en grandes cantidades para la inmunización sola o en una forma deseada para mejorar su inmunogenicidad, tal como en combinación con un adyuvante, unión a lípidos/liposomas o péptidos colaboradores, o pulsados en antígenos presentes en células. La modificación de aminoácidos individuales de los péptidos inmunodominantes para mejorar la eficiencia de la unión a antígenos de MHC puede aumentar potencialmente la inmunogenicidad en comparación con el péptido natural.

Técnicas recientes que utilizan ADN “desnudo” inyectado directamente en el músculo o en la piel han demostrado dar lugar tanto a reacciones inmunitarias celulares como humorales con antígenos codificados (Cooney, E.L., A.C. Collier, P.D. Greenberg, R.W. Coombs, J. Zarling, D.E. Arditti, M.C. Hoffman, S.L. Hu y L. Correy, 1991, *Lancet* 337:567; Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, y P. L. Felgner, 1990, *Science* 247:1465; Davis, H.L., R.G. Whalen, y B.A. Demeniex, 1993, *Hum. Gene Ther.* 4:151; Yang, N.S., J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinelli y D. McCabe. 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9568; Williams, R.S., S.A. Johnston, M. Riedy, M.J. DeVit, S.G. McElligott y J.C. Sanford, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726; fynan, E.R., Webster, D.H. Fuller, J.R. Haynes, J.C. Santoro y H.L. Robinson, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11478; Eisenbraun, M.D., D.H. Fuller y J.R. Haynes, 1993, *DNA and Cell Bio.* 12:791; Fuller, D.H. y J.R. Haynes, 1994, *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10(11):1433; Acsadi, G., G. Dickson, D.R. Love, A. Jani, F.S. Walsh, A. Gurusinghe, J.A. Wolff y K.E. Davies, 1991, *Nature* 352:815). Las técnicas que utilizan vectores de ADN presentan la ventaja de su facilidad de preparación y seguridad de administración. La secuencia alternativa de ácido nucleico de la presente invención es útil como inmunógeno y como vacuna de ADN contra el cáncer. La secuencia de ácido nucleico con marco de lectura abierto alternativo de la presente invención de TRP-1 o péptidos de la presente invención se puede administrar utilizando un cañón génico en cantidades que producen una respuesta celular contra una célula cancerosa. Cantidades en nanogramos sirven para tales propósitos.

Una forma eficaz de inmunización implica la incorporación de genes que codifican moléculas inmunógenas en bacterias recombinantes tales como BCG, *Salmonella* o *Listeria* o en virus recombinantes tales como vacunas, viruela aviar o adenovirus y similares. Los genes que codifican antígenos del cáncer pueden expresarse solos o en combinación con genes que codifican moléculas inmunoestimulantes u otros genes que pueden potenciar la respuesta inmunitaria tras la infección. Estudios con un modelo de antígenos tumorales en modelos murinos han demostrado que la incorporación del gen para interleucina-2 (IL-2) o B7.1 puede aumentar la inmunogenicidad del modelo de antígenos tumorales e incluso mediar la remisión de metástasis pulmonares probadas que producen estos antígenos. La inmunoterapia activa seguida de la administración exógena de citocinas inmunoestimulantes tales como IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 o IL-15 puede también utilizarse para mejorar las respuestas inmunitarias.

La inmunoterapia pasiva con células inmunes modificadas genéticamente (denominada generalmente inmunoterapia adoptiva) capaz de reconocer antígenos tumorales humanos es eficaz en la mediación de la remisión del cáncer en pacientes seleccionados con melanoma metastásico. Se han desarrollado técnicas *in vitro* en las que los linfocitos humanos se sensibilizan *in vitro* en péptidos inmunodominantes de antígeno tumoral presentados en antígenos presentes en células. Mediante estimulación repetitiva *in vitro* se pueden obtener células con una capacidad mucho mayor para reconocer antígenos tumorales humanos que los TIL que se utilizaron para clonar los genes que codifican estos antígenos. De este modo por sensibilización repetida *in vitro* con péptidos del cáncer, se podrían obtener linfocitos con 50 a 100 veces más potencia que TIL. La transferencia adoptiva de estas células puede ser más eficaz para mediar la remisión del tumor *in vivo* que los TIL desarrollados convencionalmente.

En los procedimientos para prevenir o inhibir el cáncer, se pueden administrar péptidos del cáncer o sus fragmentos mediante una de las diversas vías que incluyen pero no se limitan a la intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intratecal, intrapleural, intrauterina, rectal, vaginal, tópica, intratumoral y similares.

La administración puede ser por medios transmucósicos o transdérmicos. Para la administración transmucósica o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para permear la barrera. Dichos penetrantes son conocidos generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucósica sales biliares y derivados del ácido fusídico. Además, se pueden utilizar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucósica puede realizarse mediante, por ejemplo, atomizadores nasales o supositorios. Para la administración oral, el péptido del cáncer, el antígeno tumoral, sus fragmentos o variantes se formulan en formas para administración oral convencional tales como cápsulas, comprimidos y tóxicos.

En general, es deseable proporcionar al receptor una dosis de péptido del cáncer o de un fragmento del mismo de por lo menos aproximadamente 1 pg por Kg de peso corporal, preferentemente de por lo menos aproximadamente 1 ng por Kg de peso corporal, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 1 µg o más por Kg de peso corporal del receptor. Se prefiere un intervalo comprendido aproximadamente entre 1 ng por Kg de peso corporal y aproximadamente 100 mg por Kg de peso corporal aunque se puede administrar una dosis menor o mayor. La dosis es eficaz para cebar, estimular y/o producir la expansión clonal de linfocitos T específicos del antígeno del cáncer, preferentemente linfocitos T citotóxicos, que a su vez son capaces de prevenir o inhibir el cáncer en el receptor.

La dosis se administra por lo menos una vez y se puede proporcionar en forma de embolada en administración continua. Puede ser preferible la administración múltiple de la dosis durante un periodo de varias semanas a meses. Se pueden administrar dosis posteriores como se indica.

En un procedimiento de tratamiento, se administra una vacuna que comprende el péptido del cáncer o un fragmento del mismo a un mamífero en una cantidad eficaz para prevenir el cáncer en mamíferos. Es de particular interés una vacuna que comprende el péptido del cáncer o un fragmento del mismo codificado por ORF3 del gen TRP-1 para la prevención del melanoma.

En un procedimiento de reducción de la masa tumoral en animales con tumores el procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz de un epítipo antigénico del cáncer en un punto de la masa tumoral, dicha cantidad es eficaz para reducir el tamaño del tumor en el punto.

En otro procedimiento de tratamiento, se pueden obtener linfocitos citotóxicos autólogos o linfocitos de infiltración en el tumor de un paciente con cáncer. Los linfocitos se desarrollan en cultivos y los linfocitos específicos antígenos del cáncer se extienden por cultivo en presencia de péptido del cáncer específicos o epítipo antigénicos del cáncer solos o en combinación por lo menos con una molécula inmunoestimulante con citocinas. Los linfocitos específicos del antígeno se vuelven a infundir a continuación en el paciente en una cantidad eficaz para reducir o eliminar los tumores en el paciente.

Después de la inmunización se puede evaluar la eficacia de la vacuna mediante la producción de células inmunes que reconocen el antígeno del cáncer, según se evalúa por actividad lítica específica, producción de citocina específica, remisión del tumor o una combinación de éstos. Si el mamífero que se ha de inmunizar está ya afectado por el cáncer o por metástasis de cáncer se puede administrar la vacuna conjuntamente con otros tratamientos terapéuticos tales como con inmunodilatadores, por ejemplo, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, interferón, factor de necrosis tumoral y similares, fármacos quimioterapéuticos como cisplatino, antivíricos tales como ganciclovir, anfotericina B, antibióticos y similares.

Otro aspecto de la invención es una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo de un gen TRP-1 en la que la secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo codifica péptidos del cáncer y sus fragmentos que reconocen inmunológicamente los linfocitos T del sistema inmunitario.

La secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo incluye las secuencias de ADN del gen TRP-1.

Son de interés las secuencias de ADN con marco de lectura abierto alternativo de un gen melanógeno. Los genes melanógenos incluyen los genes codificadores de gp 75 (TRP-1).

Una forma de realización de la invención es una secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo o un fragmento de la misma que codifica un péptido del cáncer procedente del interior de la secuencia del gen que codifica la proteína relacionada con la tirosinasa. Se ha descrito la secuencia génica para TRP1 mediante el banco de datos de EMBL bajo el número de registro X51455 tal como describe Vijayasaradhi, S. *et al.* (1990, *J. Exp. Med.* 171:1375-80) y el número de registro de EMBL X51420 tal como describe Cohen, T. *et al.* 1990 *Nucleic Acids Research*, vol. 18:2807.

En una forma de realización, la secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo comprende ORF3 representado en la Figura 2 con la SEC ID n°: 5, los fragmentos de la misma y su variante de la secuencia funcionalmente equivalente que codifica un péptido del cáncer o los fragmentos del mismo reconocidos por linfocitos T específicos del antígeno del cáncer que incluyen los linfocitos de infiltración en el tumor. Asimismo están comprendidos en la presente invención las secuencias de ácido nucleico complementarias, así como anticomplementarias a ORF3 representadas en la Fig. 2.

En otra forma de realización, la secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo comprende:

ATGTCACTGCAACGGCAATTTCTCAGG (SEC ID n°: 10).

La secuencia génica para TRP-2 ha sido descrita mediante el banco de genes en el número de registro D17547 como describe Yokoyama *et al.* (1994) y el número de registro S69231 del banco de genes como describe Bouchard *et al.* (1994).

Debido a la degeneración en el código genético, variaciones en la secuencia del ADN producirán la traducción de un péptido del cáncer equivalente. Como resultado, las sustituciones están incluidas en el ámbito de la invención mientras la sustitución produce la expresión de un péptido del cáncer que reconocen los linfocitos T restringidos por MHC del antígeno del cáncer. Una sustitución comprendida en la presente invención es la sustitución de Ser codificada por TCA por Ala codificada por GCT, GCC, GCA o GCG. Los homólogos de otras especies de mamíferos están incluidos dentro del ámbito de la invención.

Toda o parte de la secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo como por ejemplo desde el gen TRP-1 y similares se pueden utilizar como sondas para identificar y aislar los homólogos del péptido del cáncer en otra especie de mamífero.

En una forma de realización, se utiliza una secuencia de ADNc murino para cribar un banco de ADNc de mamífero para una secuencia de ácido nucleico homólogo humano. Se seleccionan y secuencian los clones positivos. Ejemplos de fuentes de tejido a partir de los que se puede sintetizar el banco de ADNc incluyen, pero no se limitan a, la dermis, epidermis, tumores sólidos, melanomas, melanocitos y similares. Un experto en la técnica comprenderá las condiciones de hibridación apropiadas que se deben utilizar para detectar los homólogos. Los procedimientos convencionales para la construcción de bancos de hibridación de ácido nucleico y las técnicas de clonación se describen en Sambrook

et al., (eds) (1989) en "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York y Ausubel *et al.* (eds) en "Current Protocols in Molecular Biology" (1987), John Wiley and Sons, Nueva York, Nueva York.

Otro aspecto de la invención son las sondas de ácido nucleico para la detección y cuantificación del ARN que transcribe los péptidos del cáncer tales como los codificados por un marco de lectura abierto alternativo del gen TRP-1 en muestras biológicas aisladas de un mamífero con cáncer. Las alteraciones en la concentración de ARN en comparación con una muestra de ARN de referencia son útiles en el diagnóstico y en el pronóstico de la enfermedad en el mamífero.

En una forma de realización, el ARNm procede del tejido de un paciente que se sospecha que padece cáncer o precáncer y se compara con el ARNm procedente de un individuo sano de referencia. Un aumento cuantitativo y/o cualitativo del ARNm con marco de lectura abierto alternativo del gen TRP-1 que codifica un péptido del cáncer en el paciente, en comparación con la referencia, es indicador de cáncer o precáncer en el paciente. Se puede detectar el ARNm utilizando sondas de oligonucleótido hibridables con el ARNm. En una forma de realización la sonda es hibridable con el producto de transcripción de ORF3 de TRP-1.

Las alteraciones en la concentración de ARN en comparación con una muestra de ARN de referencia son útiles en el diagnóstico y en el pronóstico de la enfermedad en el mamífero.

El ARNm puede ser detectado utilizando sondas oligonucleótidas.

Se pueden utilizar combinaciones de oligonucleótidos basadas en la secuencia de codificación del péptido o de fragmentos del mismo como cebadores de PCR para detectar ARNm en muestras biológicas utilizando el procedimiento de reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para amplificar las secuencias de ARN seleccionadas. La presente invención abarca también la PCR *in situ* y la RT-PCR *in situ* para la detección de ADN y ARN que codifican péptidos del cáncer o fragmentos de los mismos. Se prefiere la técnica cuando el número de copias de un ácido nucleico objetivo es muy bajo o cuando se pueden distinguir diferentes formas de ácido nucleico. El procedimiento es especialmente útil en la detección y diferenciación de células precancerosas y cancerosas de las células normales.

La presente invención incluye un procedimiento de identificación de un epítipo antigénico del cáncer reactivo con los linfocitos T específicos del antígeno que comprenden la generación de fragmentos de delección de ácido nucleico de un gen. Los fragmentos de delección se sitúan en un vector apropiado que a su vez se transfieren o transducen a la célula huésped para la expresión del producto del ácido nucleico. Opcionalmente, la célula huésped puede expresar también una molécula inmunoestimulante. Las respuestas del linfocito T específico del antígeno del cáncer se determinan en presencia de la célula huésped que expresa el producto de delección.

En el caso en que la célula huésped exprese solamente el producto de delección, un antígeno presente en la célula, tal como un linfocito B, macrófago, dendrocitos y similares, puede proporcionar una molécula inmunoestimulante o mediante una célula transfectada con una molécula estimulante. En una forma de realización, la molécula inmunoestimulante es una molécula MHC de clase I.

Mediante la cartografía que utiliza este enfoque, se determina la secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo que codifica el péptido del cáncer o el epítipo antigénico del cáncer.

Un procedimiento alternativo de identificación del antígeno del cáncer y del epítipo antigénico del cáncer consiste en la generación de péptidos sintéticos, antígenos pulsantes presentes en células con los péptidos sintéticos y en añadir el antígeno pulsado con el péptido presente en las células con linfocitos T específicos del antígeno y midiendo la respuesta específica del antígeno de los linfocitos T en presencia del antígeno pulsado con el péptido presente en las células. Los péptidos sintéticos que se producen en las respuestas de los linfocitos T específicos del antígeno contienen el epítipo antigénico del cáncer de la presente invención.

La presente invención comprende asimismo el vector que comprende la secuencia de ADN del marco de lectura abierto alternativo que codifica los péptidos del cáncer o el epítipo del cáncer antigénico. Opcionalmente el vector puede comprender asimismo una secuencia de ADN que codifica por lo menos una molécula inmunoestimulante. En una forma de realización el vector comprende ORF-3 del gen TRP-1.

Los vectores de expresión eucarióticos comprenden, pero no se limitan a, vectores retrovíricos, vectores virales de vacunas, vectores de adenovirus, vectores del virus del herpes, vectores del virus de la viruela aviar, vectores de baculovirus, vectores de virus del papiloma humano, vectores de la encefalitis equina, vectores del virus de la gripe y similares.

La presente invención abarca nuevos virus recombinantes que expresan un péptido del cáncer o un fragmento del mismo codificado por una secuencia de ácido nucleico con marco de lectura abierto alternativo de un gen TRP-1. El virus recombinante puede expresar también por lo menos una molécula inmunoestimulante. El virus recombinante es capaz de producir o sobreregular una respuesta inmunitaria mediada por la célula en un mamífero con objeto de prevenir o tratar el cáncer en el mamífero, particularmente en el hombre.

El virus recombinante ha incorporado en su genoma o en un fragmento del mismo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido del cáncer, un fragmento del mismo o un epítipo antigénico del cáncer, solo o en combinación con uno o más genes que codifican una molécula inmunoestimulante. En una forma de realización, el virus recombinante ha incorporado en su genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido del cáncer codificado por un marco de lectura abierto alternativo de TRP-1 o de un fragmento del mismo. Una célula huésped infectada con el virus recombinante expresa el péptido del cáncer, un fragmento del mismo o un epítipo antigénico del cáncer, solo o en combinación por lo menos con una molécula inmunoestimulante.

Los procedimientos para construir y expresar productos génicos exógenos de vectores de virus de vacunas recombinantes están descritos por Perkus *et al.*, *Science* 229:981-984, 1985, Kaufman *et al.*, *Int. J. Cancer* 48:900-907, 1991, Moss *Science* 252:1662, 1991, Smith y Moss *BioTechniques* Nov/Dic, págs. 306-312, 1984, y la patente U.S. nº 4.738.846. Sutter y Moss (*Proc Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 89:10847-10851, 1992) y Sutter *et al.* (*Virology* 1994) describen la construcción y utilización como vector del virus de Ankara recombinante no replicante (MVA, vacuna Ankara modificada) que se puede utilizar como vector vírico en la presente invención. Baxby y Paoletti (*Vaccine* 10:8-9, 1992) describen la construcción y utilización como vector de un virus de viruela no replicante, incluyendo el virus de la viruela del canario, el virus de viruela aviar y de otras especies de aves para su utilización como vector vírico en la presente invención.

Los vectores de la presente invención pueden estar situados en una célula huésped apropiada para la expresión de un péptido del cáncer o de un epítipo antigénico del cáncer. Las líneas celulares del huésped eucariótico incluyen, pero no se limitan a las células COS, células CHO, células Hela, células NIH/3T3, células de insecto, antígenos presentes en células tales como los dendrocitos y similares. Opcionalmente la célula huésped puede expresar también una molécula estimulante. En el caso en que estas células huésped expresen tanto el péptido del cáncer como el epítipo antigénico del cáncer en combinación, por lo menos, con una molécula de MHC, es preferible que se pueda utilizar un sistema de expresión eucariótico para permitir la propia glucosilación. La expresión tanto del antígeno del cáncer como de la molécula inmunoestimulante por la célula huésped proporciona el péptido restringido por MHC necesario a los linfocitos T específicos y la señal apropiada a los linfocitos T para ayudar al reconocimiento del antígeno y a la proliferación o expansión clónica de los linfocitos T específicos del antígeno. El resultado global es una hiperregulación del sistema inmunitario. La hiperregulación de la respuesta inmunitaria se manifiesta por un aumento de los linfocitos citotóxicos específicos que son capaces de destruir o inhibir el crecimiento de las células cancerosas o precancerosas.

El ADN se puede insertar en la célula huésped por transfección, transducción, liposomas y similares por los procedimientos conocidos en la técnica. (Sambrook *et al.*, (1989), en "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York). Como liposomas, se prefieren los lípidos catiónicos, por ejemplo, el lípido policationico, dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxiethyl amonio (DMRIE) acompañado con el fosfolípido neutro dioleil fosfatidil-etanolamina (DOPE) tal como expuso Nabel E.G. *et al.*, 1992, *Hum. Gene. Ther.* 3:367-275; Nabel G.J. *et al.*, 1992, *Hum. Gene. Ther.* 3:649-656; Stewart M.J. *et al.*, 1992 *Hum. Gene. Ther.* 3:399-410; Nabel G.J. *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11307-11311; y Harrison, G.S. *et al.*, 1995, *BioTechniques* 19:816-823.

La proteína recombinante del cáncer, el antígeno tumoral o el epítipo antigénico del cáncer expresados por las células huésped se pueden purificar de los lisados celulares o de los sobrenadantes celulares por los procedimientos habituales de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Éstos incluyen, pero no están limitados a cromatografía en tamices moleculares, cromatografía de intercambio iónico, enfocado isoeléctrico, electroforesis en gel, cromatografía por afinidad, HPLC, HPLC en fase inversa y similares. (Ausubel *et al.*, 1987, en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York, NY). Se puede utilizar también la cromatografía de inmuoafinidad para la purificación utilizando, como agente de inmuoafinidad, anticuerpos de proteína anticancerosa o fragmentos de fijación al antígeno de los mismos tal como se describe en la presente memoria.

Se puede utilizar asimismo el virus recombinante como terapéutico o vacuna. En dichas utilizaciones es deseable proporcionar al receptor una dosis de virus recombinante en el intervalo comprendido entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de placa/mg de mamífero, aunque se puede administrar una dosis inferior o superior.

El vector vírico recombinante se puede introducir en un mamífero bien antes de cualquier prueba de cáncer tal como melanoma o para mediar la remisión de la enfermedad en un mamífero afectado por un cáncer tal como melanoma. Ejemplos de procedimientos para administrar el vector vírico en mamíferos incluyen, pero no están limitados a, la exposición de las células al virus recombinante *ex vivo*, o inyección del virus recombinante en el tejido afectado o la administración intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular y similares del virus. Por otra parte, el vector vírico recombinante o la combinación de vectores víricos recombinantes se puede administrar localmente por inyección directa en la lesión cancerosa o por aplicación tópica en un excipiente adecuado farmacéuticamente aceptable. La cantidad de vector vírico recombinante, que lleva la secuencia de ácido nucleico en cuestión se basa en el valor de partículas de virus. Un intervalo preferido para inmunización está comprendido entre aproximadamente 10^5 y 10^{10} partículas de virus por mamífero, preferentemente el hombre.

El epítipo de antígeno del cáncer de la presente invención que está implicado en el rechazo del tumor no está limitado a lo expuesto específicamente en la presente memoria. Utilizando los procedimientos expuestos en la presente invención se pueden identificar otros epítopos de antígeno del cáncer contenidos en productos con marco de lectura

abierto alternativo a partir de otros antígenos asociados al tumor (Van der Bruggen, P. *et al.*, 1991 *Science* 254:1643-47; Gaugler, B. *et al.*, 1994, *J. Exp. Med.* 179:921-30; Boel, P. *et al.* 1995 *Immunity*. 2:167-75; Brichard, V. *et al.* 1993, *J. Exp. Med.* 178:489-95; Robbins, P.F. *et al.*, 1994, *Cancer Research* 54:3124-26; Kawakami, Y. *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3515-19; Coulie, P.G. *et al.* 1994, *J. Exp. Med.* 180:35-42; Bakker, A. *et al.*, 1994, *J. Exp. Med.* 179:1005-09) tales como de MART-1/Melan A (Kawakami *et al.*, *J. Exp. Med.* 180:347-352, 1994), MAGE-3 (Gaugler *et al.*, *J. Exp. Med.* 179:921-930, 1994), gp 100 (Kawakami *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:6458-6462, 1994), tirosinasa (Brichard *et al.*, *J. Exp. Med.* 178:489, 1993), TRP-2, CEA, CA-19-A, CA-125, PSA, erb-2 (Boon *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 12:337, 1994).

Los linfocitos infiltrantes en el tumor (TIL) procedentes de pacientes que padecen de tumor reconocen los antígenos asociados al tumor presentados por las moléculas de clase I (MHC) del complejo de histocompatibilidad principal. La infusión de TIL586 junto con interleucina-2 (IL-2) en el paciente autólogo con melanoma metastásico produjo la remisión objetiva del tumor. Se aisló recientemente un gen que codifica un antígeno tumoral reconocido por TIL586 y demostró que codificaba gp75. La presente invención es la identificación y aislamiento de un péptido antigénico, MSLQRGFLR (SEC ID n°: 9), reconocido por TIL586, que no procede de la proteína gp75 normal. En lugar de este péptido noámero producido a partir de la traducción de un marco de lectura abierto alternativo o del mismo gen. De este modo, el gen gp75 codifica dos polipéptidos completamente diferentes, gp75 como antígeno reconocido por los anticuerpos de IgG en el suero de un paciente con cáncer y un producto de 24 aminoácidos como antígeno de rechazo tumoral reconocido por los linfocitos T. Esto representa la primera demostración de que el antígeno humano de rechazo tumoral se puede generar a partir de un gen celular normal utilizando otro marco de lectura abierto aparte del utilizado para codificar la proteína normal. Este descubrimiento dio a conocer un nuevo mecanismo para generar antígenos tumorales, que pueden ser útiles como vacunas para producir inmunidad contra el cáncer mediada por las células específicas del tumor.

El procedimiento de análisis por delección de ExoIII/S1 localizó el epítipo en un pequeño fragmento de ADN del gen gp 75. El epítipo del cáncer estaba ausente en la proteína gp75 normal. El péptido del cáncer de la presente invención reconocido por TIL586 procedía del producto génico traducido procedente de un marco de lectura abierto alternativo del mismo gen que codifica la proteína gp 75 normal. La sustitución de ATG por ATC en los nucleótidos 294 a 296 produjo una pérdida completa de la capacidad para estimular la liberación de citocina procedente de TIL586. Los experimentos de inhibición del objetivo frío indicaron que el epítipo del cáncer identificado era capaz de competir por el reconocimiento de linfocitos T con un péptido procesado de forma natural presente en las células tumorales. Seis clones de linfocitos T generados a partir de la línea celular de TIL586 fueron capaces de reconocer las células tumorales 586 mel, los linfocitos B 586EBV pulsados con este péptido y los melanocitos normales en un modo restringido por HLA-A31, sugiriendo también que el producto génico codificado por el marco de lectura abierto alternativo puede estar presente en las células tumorales así como en los melanocitos normales.

La invención proporciona un animal transgénico que ha incorporado en su genoma una o más copias de la secuencia de ADN con marco de lectura abierto alternativo que codifica un péptido del cáncer o un fragmento del mismo. El procedimiento general de producción de animales transgénicos se describe en Krimpenfort *et al.*, patente U.S. n° 5.175.384, Leder *et al.*, patente U.S. n° 5.175.383, Wagner *et al.*, patente U.S. n° 5.175.385, Evans *et al.*, patente U.S. n° 4.870.009 y Berns patente U.S. n° 5.174.986. La incorporación del gen produce sobreexpresión, expresión alterada o expresión de formas múltiples o variantes de los péptidos del cáncer. El animal transgénico resultante es útil en los estudios de desarrollo del cáncer o del antígeno tumoral de la presente invención. El modelo animal es útil en la identificación de vacunas y fármacos quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer. El animal transgénico es también útil en estudios de desarrollo del cáncer.

Esta invención comprende además un anticuerpo o a un fragmento de fijación al antígeno del mismo, producido por inmunización del péptido del cáncer o del epítipo antigénico del cáncer de la presente invención. En el caso en que el péptido del cáncer o el epítipo del cáncer antigénico esté compuesto por sólo unos pocos aminoácidos, el péptido del cáncer o el epítipo antigénico del cáncer se pueden conjugar con una proteína transportadora para producir una respuesta del anticuerpo. Las proteínas transportadoras tales como KLH, el toxoide antitetánico y similares y los procedimientos de conjugación son conocidos en la técnica. El anticuerpo presenta especificidad para, y reacciona y se une con el péptido del cáncer y con el epítipo antigénico del cáncer de la presente invención.

Ejemplos de moléculas de anticuerpo son las moléculas de inmunoglobulina íntegras, fundamentalmente las moléculas de inmunoglobulina íntegras o aquellos fragmentos de inmunoglobulina que contengan la zona de fijación al antígeno incluyendo aquellas porciones de moléculas de inmunoglobulina conocidas en la técnica como F (ab), F (ab'), F (ab')₂, anticuerpo híbrido humanizado y F (v). Se pueden producir anticuerpos policlonales o monoclonales por los procedimientos conocidos en la técnica. (Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256, 495-497; Campbell "Monoclonal Antibody Technology, the Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" en Burdon *et al.* (eds.) (1985) "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", vol. 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam). Se pueden producir también anticuerpos o los fragmentos de fijación al antígeno por ingeniería genética. La tecnología para la expresión tanto de los genes de cadena ligera como pesada es el asunto de las solicitudes de patente PCT: publicación n° WO 901443, n° WO 9014424, Hus *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281 y la patente U.S. n° 4.946.778.

En una forma de realización, se utilizan anticuerpos de la invención en inmunoanálisis para detectar péptidos del cáncer incluyendo los péptidos codificados por un marco de lectura alternativo de TRP-1 o los fragmentos de

los mismos en muestras biológicas. Los anticuerpos o los los fragmentos de fijación al antígeno de los mismos se pueden utilizar para detectar péptidos del cáncer en muestras de biopsia de tejidos de un mamífero afectado por el cáncer. La evaluación del antígeno del cáncer en un tejido enfermo se puede utilizar para pronosticar la evolución de la enfermedad en un mamífero o se puede diagnosticar la eficacia del tratamiento. El inmunoanálisis puede ser radioinmunoanálisis, análisis de transferencia de Western, análisis de inmunofluorescencia, inmunoanálisis de enzimas, análisis de quimioluminiscencia, análisis inmunohistoquímico y similares y se puede realizar *in vitro*, *in vivo* o *in situ*. Las técnicas estándar conocidas en la técnica para ELISA se describen en "Methods in Immunodiagnosis", 2ª edición, Rose and Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell *et al.* "Methods and Immunology", W.A. Benjamin, Inc., 1964; y Oellerich, M. 1984, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22:895-904. Los procedimientos convencionales para inmunohistoquímica están descritos en Harlow and Lane (ed.) (1988) en "Antibodies A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Ausbel *et al.* (eds.) (1987) en Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley and Sons (Nueva York, NY). Las muestras biológicas apropiadas para dicho análisis de detección incluyen pero no se limitan a células, biopsia de tejidos, sangre completa, plasma, suero, esputos, fluido cerebroespinal, fluido pleural, orina y similares.

Se pueden utilizar también en inmunología los anticuerpos o los fragmentos de fijación al antígeno de la presente invención. Los anticuerpos o los fragmentos de fijación al antígeno de los mismos se suministran a un animal en una cantidad suficiente para impedir, disminuir o atenuar la gravedad, extensión o duración del cáncer. Toda referencia a TRP2 en los ejemplos siguientes se proporciona únicamente a título ilustrativo.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Productos químicos y reactivos

Los siguientes productos químicos y reactivos se adquirieron a los proveedores indicados: RPMI 1640, medio AIM-V, Lipofectamina, G418 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD); vector de expresión eucariótica pCR3 (Invitrogen, San Diego, CA); anticuerpo monoclonal anti-HLA-A31 (One lambda, Canoga Park, CA); anticuerpo de anti-inmunoglobulina M conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

Linfocitos T citotóxicos (CTL) y líneas celulares

Se aislaron TIL586 de una muestra del tumor de un paciente con melanoma metastásico y se cultivaron en un medio conteniendo IL-2 (6000 IU/ml) (Chiron) durante 32 a 60 días como se describió anteriormente (Topalian, S., D. Solomon, F. P. Avis, A. E. Chang, D. L. Freeksen, W. M. Linehan, M. T. Lotze, C. N. Robertson, C. A. Seipp, P. Simon, C. G. Simpson y S. A. Rosenberg, 1988, *J. Clin. Oncol.* 6:839-53). Los TIL586 fueron principalmente linfocitos T CD8⁺. Los TIL1200 se cultivaron en las mismas condiciones descritas para TIL586. Los clones de linfocitos T se generaron por el procedimiento de dilución limitada a partir de la línea celular TIL586 y a continuación se extendieron en un medio AIM-V conteniendo 6000 IU/ml de IL-2.

Las líneas celulares de melanoma 397 mel, 397 mel/A31, 586 mel, 624 mel y las líneas celulares B transformadas por EBV 586EBV y 1510EBV se crearon en este laboratorio y se cultivaron en medio RPMI 1640 conteniendo 10% de suero de ternero fetal (FCS). Melanocitos normales cultivados procedentes del prepucio de un bebé (NHEM680 adquirido en Clonetics, CA) se cultivaron en medio de cultivo de melanocitos (MGM; Clonetics, CA). La línea celular COS-7 fue suministrada por el Dr. W. Leonard (NIH).

Análisis de la secreción GM-CSF

La transfección del ADN y el análisis de GM-CSF se realizaron como se describió anteriormente (Wang, R. F.; P. F. Robbins, Y. Kawakami, X. Q. Kang y S. A. Rosenberg, 1995, *J. Exp. Med.* 181:799-804). En resumen, se mezclaron 200 µg de ADN que lleva un fragmento diferente y 50 ng de ADN de HLA-A31 con 2 µl de lipofectamina en 100 µl de DMEM durante 15 a 45 min. La mezcla ADN/lipofectamina se añadió a continuación a las células COS-7 (5 × 10⁴ células) y se incubó toda la noche. Al día siguiente, se lavaron las células dos veces con medio DMEM. Se añadió TIL586 a una concentración de 1 × 10⁵ células/pocillo en medio AIM-V conteniendo 120 IU/ml de IL-2. Después de 18 a 24 h de incubación, se recogió 100 µl de sobrenadante y se midió GM-CSF en un análisis ELISA estándar (R + D Systems, Minneapolis, MN). Para los péptidos, se incubaron células 586EBV, 1510EBV y linfocitos T2 con péptidos a 37°C durante 90 min, y a continuación se lavó tres veces con medio AIM-V conteniendo 120 IU/ml de IL-2. Se añadió TIL586 y se incubó durante otras 18 a 24 h, se recogió 100 µl de sobrenadante para análisis de GM-CSF.

ES 2 305 379 T3

Construcciones de delección de Exo III/S1 y fragmentos de PCR

Para realizar una serie de delecciones, se digirió el ADN del plásmido pADNc776 con Xba I y se rellenó con trifosfatos de alfa-fosforotioato desoxirribonucleótido para bloquear la digestión de la Exo III nucleasa. El plásmido pADNc776 es un derivado del vector pADNc3 que contiene un fragmento de ADN de 2,4 kb y un activador CMV para dirigir la transcripción. Se sometió ADN linealizado a la digestión del segundo enzima de restricción Xho I para generar un extremo sensible a Exo III. La delección de Exo III nucleasa / nucleasa de la alubia de Mung se realizó según las instrucciones del fabricante (Stratagene, CA). El protocolo detallado es el siguiente:

1. Se digirió 10 μ g de ADN con Xba I y se rellenó con alfa-fosforotioato desoxirribonucleótido.
2. Se digirió el ADN con el segundo enzima Xho I seguido de extracción con fenol y precipitación con etanol.
3. Se secó el sedimento de ADN y se puso en suspensión en 125 μ l de tampón 2X Exo, 25 μ l de β -mercaptoetanol 100 mM y 100 μ l de agua.
4. Cuando todas las alícuotas se habían eliminado y colocado en nieve carbónica, se calentaron los tubos a 68°C durante 15 minutos y a continuación se colocaron en hielo.
5. Se añadió 15 U de nucleasa de alubia de Mung (diluida previamente con tampón de dilución 1X de alubia de Mung) a cada tubo de punto de tiempo y se incubaron durante 30 minutos a 30°C.
6. Se añadió lo siguiente:
 - 4 μ l de SDS al 20%
 - 10 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 9,5
 - 20 μ l de LiCl 8 M
 - 250 μ l de tampón fenol:cloroformo equilibrado
7. Se agitaron las muestras, se centrifugaron 1 minuto en microcentrífuga, se eliminó la capa acuosa superior y se extrajo con cloroformo para extraer la proteína de la alubia Mung del ADN.
8. Se añadió 25 μ l de NaOAc 3 M pH 7,0 a la fase acuosa. Se utilizó ARNt a una concentración final de 10 ng/ μ l como vehículo para la precipitación.
9. Se añadió 650 μ l de etanol frío. Se enfriaron las muestras 10 minutos en nieve carbónica y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 20 minutos.
10. Se drenó el sobrenadante y se lavaron los sedimentos con etanol al 80%.
11. Se secó el sedimento.
12. Se redisolvió el sedimento de ADN en 15 μ l de Tris-Cl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM.

B. Ligadura

13. Las delecciones de ADN se ligaron utilizando las siguientes condiciones:

ADN tratado con 1,0 μ l de Exo/Mung

10X 2,0 μ l de tampón de ligadura

Tris-HCl 500 mM, pH 7,5

MgCl₂ 70 mM

DTT 10 mM

2,0 μ l de ATP 5 mM, pH 7,0-7,5

2,0 μ l de T4 ADN ligasa (Cat. n° 600011; suministrado en maletín)

13,0 μ l de H₂O

ES 2 305 379 T3

20.0 μ l volumen de reacción total

Incubados a temperatura ambiente

Stratagene suministra un maletín de ligadura de ADN (Cat. n° 203003) para ligaduras, inserciones o vectores.

14. Se utilizó 7 μ l del ADN restante tratado con 14 μ l de Exo/Mung para el análisis de electroforesis en gel.

15. Se utilizó 1 μ l de la reacción de ligadura para transformar 100 μ l de células RecA-JM109 de *Epicurian coli* o de XL1-Blue y se colocaron en placas con LB/AMP.

C. Técnica de agarosa con bajo punto de fusión

Para minimizar la identificación de las deleciones, se introdujo un fragmento de deleción en agarosa de bajo punto de fusión, se escindió la banda de interés y se continuó la ligadura. Se mantuvo la concentración de agarosa por debajo del 0,5% en la reacción de ligadura.

La amplificación por PCR se realizó a 94°C durante 2 min seguido de 25 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 45 seg y 72°C durante 1 min. Se utilizaron cebadores gpN (5'AGAATGAGTGCTCCTAAACTCTCTCTCTGGG) (SEC ID n°: 42) y gp11B (5'CATGTGAGA AAAGCTGGTCCCTCA) (SEC ID n°: 43) para generar el fragmento de ADN (1-667) y a continuación se clonó en el vector de expresión pCR3 para producir pPCR110. Los plásmidos pPCR210 y pPCR220 eran vectores pCR3 que contienen fragmentos de inserción de ADN amplificados utilizando cebadores gp-1 (5'TGGATATGGCAAAGCGCACAACTC) (SEC ID n°: 44) y gp11B, gp-1 y gp22 (5'TAAATG GAAATGTTCTCAAATTGTGGCGTG) (SEC ID n°: 45), respectivamente.

Ensayos de lisis citotóxica

El ensayo citolítico se realizó como se describió anteriormente (Kawakami, Y. *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6458-62). En resumen, las células objetivo se marcaron con cromo durante 90 min. Después de lavar tres veces, se incubaron las células con péptidos a una concentración de 1 μ g/ml durante 90 min. Se lavaron de nuevo las células, se hizo el recuento y a continuación se mezclaron con TIL586 a la proporción indicada de efector:objetivos (E:T). Se midió la liberación de cromo después de 4 h de incubación. Los péptidos se sintetizaron por un procedimiento en fase sólida utilizando un sintetizador de péptidos (modelo AMS 422, Gilson Co., Inc., Worthington, OH). Se purificaron algunos péptidos por HPLC y presentaron una pureza mayor del 98%. Para la valoración del péptido ORF3P reconocido por TIL586, se incubaron linfocitos B de 586EBV con varias concentraciones de péptido ORF3P purificado. Se determinó el porcentaje de lisis específica mediante la ecuación $(A-B)/(C-B) \times 100$, en la que A es la lisis de los linfocitos B de 586EBV por TIL586 en presencia de un péptido, B es la liberación espontánea de los linfocitos B de 586EBV en presencia del mismo péptido pero en ausencia de las células del efector y C es la liberación máxima de cromo. Se realizó la inhibición de la citólisis por el objetivo frío utilizando células 586 mel o 624 mel marcadas con ^{51}Cr como objetivos "calientes" y linfocitos B de 586EBV y T2 pulsados con péptidos como objetivos "fríos".

Mutagénesis direccionada al punto

Para la construcción de la mutagénesis direccionada al sitio, se utilizaron cebadores mutados GPMUT1 (5'GC-CATGGGCAGAGATGATCGGGAGGTCTGGCCCTTGCCTTCTTCAATAGGACATCTCACTGCAAC) (SEC ID n°: 11) y GPA1 para generar un fragmento por PCR que contiene una mutación (G a C) en el nucleótido 296. Se amplificaron los fragmentos de ADN natural utilizando cebadores GPF1 (5'GAAGATCTGCCATGGGCAGAGATGATCGG GAGGTCTG) (SEC ID n°: 12), GPE1 (5'GAATTCGTTGTGTCCTGAGAAATTGCCGTTG) (SEC ID n°: 13), GPE2 (5'GAATTCGACTATGAGAACCCCTCTGGTCACAGGC) (SEC ID n°: 14) y GPA1 (5'AAGATCTGGGCCCCGGA CAAAGTGGTTCTTTTC) (SEC ID n°: 15) como se indicó mediante puntas de flecha en la Fig. 3A. Los productos de PCR purificados se clonaron a continuación en el vector de expresión pCR3. Se secuenciaron todos los plásmidos que contienen fragmentos de PCR para confirmar la orientación y secuencia del nucleótido.

Ejemplo 2

Localización de el/los péptido(s) antigénico(s) reconocidos por TIL586

Con el fin de identificar el epítipo antigénico procedente de gp75, se generó una serie de deleciones anidadas del gen gp75 desde el extremo 3' utilizando Exo III/S1 nucleasa así como fragmentos de ADN adicionales procedentes de gp75 mediante amplificación por PCR (Fig. 1A). La razón por la que se seleccionó pADNc776 como material de partida para los estudios de deleción es que este clon se purificó inicialmente por cribado de una biblioteca y confirió la capacidad para estimular la liberación de citocina de TIL586. El plásmido pADNc776 se depositó en la American

Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD en los términos del tratado de Budapest del 19 de enero de 1996 y se asignó el número de registro, ATCC 97423. ya que el objetivo de este estudio era identificar el epítipo reconocido por TIL586, se utilizaron fragmentos lo más cortos posibles (la forma truncada de gp75, en lugar del ADNc completo) de modo que el epítipo se pudiera localizar rápidamente en un fragmento de ADN relativamente pequeño. Se transfirieron a continuación estas construcciones de delecciones a células COS-7 junto con el plásmido pBK-CMV que contiene el gen HLA-A31. (Wang, R.F. *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* 181:799-804). Después de 24 horas, se examinaron las células COS-7 transfectadas para determinar qué construcción podría estimular la liberación de citocina por TIL586. Un fragmento pequeño de ADN truncado que oscila entre el nucleótido 247 a 771, que carece del codón de iniciación gp75 normal, conserva la capacidad para estimular la liberación de GM-CSF por TIL586, lo que sugiere que el epítipo reconocido por TIL586 estaba situado en el fragmento de ADN que contiene los nucleótidos desde 247 a 771. Ya que existe un codón de inicio ATG en un contexto relativamente bueno de la secuencia Kozak (GATATGG) (SEC ID n°: 16) situada en los nucleótidos 445 a 447 y está en el mismo marco que el marco de lectura abierto de gp75, se pensó que el epítipo reconocido por TIL586 podría estar localizado en la zona de nucleótidos 445 a 771. Por consiguiente, se construyeron pPCR210 y pPCR220, que eran derivados del vector de expresión pCR3 y contenían un codón ATG interno en el marco con gp75 (GATATGG) (SEC ID n°: 16) situado a 445 bp como codón de inicio para la traducción de la proteína gp75 normal truncada. Sin embargo, ni pPCR210 ni pPCR220 confieren la capacidad para estimular la secreción de citocina del TIL586 después de la transfección conjunta de COS-7 con el gen HLA-A31 (Fig. 1B), lo que sugiere que el epítipo estaba situado corriente arriba de estos fragmentos. Por consiguiente, se construyó un plásmido pD776A adicional, que contenía la secuencia de nucleótidos desde 247 a 442 y no tenía ningún codón ATG en el mismo marco que gp75, sino que contenía 2 codones ATG en diferentes marcos de lectura abiertos en comparación con gp75. Este plásmido estimuló intensamente la liberación de citocina por TIL586 cuando se transfectaba junto con ADNc de A31 en las células COS-7. El plásmido pPCR110 que contiene el codón de inicio auténtico de gp75 estimuló varias veces menos la liberación de citocina que lo hizo pDel 5 o pD776A cuando se transfectaba junto con el gen HLA-A31 (Fig. 1B). Estos resultados sugirieron que el/los epítipo(s) reconocido(s) por TIL586 estaban situados en la zona de los nucleótidos 247 a 442.

Aunque esta zona (nucleótidos 247 a 442) no tienen ningún codón de inicio ATG en el marco de lectura abierto gp75 normal, el inicio de la traducción desde los codones sin ATG tales como ACG, CTG y GTG se ha descrito en algunos casos (Hann, S.R. 1994, *Biochimie* 76:880-86; Muralidhar, S. *et al.*, *J. Virol.* 1994, 68:170-76). Para identificar el péptido en esta zona, se prepararon péptidos sintéticos basándose en el motivo de unión al péptido de HLA-A31 (resto hidrófobo en la posición 2 y el resto cargado positivamente en el terminal C) (Fig. 2) (Falk, K. *et al.*, *Immunogenetics* 1994, 40:238-41). La mayoría de los péptidos seleccionados para este estudio eran nonámeros, aunque algunos eran decámeros y undecámeros. Estos péptidos se pulsaron en linfocitos B de 586EBV y la capacidad de estas células para estimular la liberación de citocina por TIL586 (Tabla 1). Un péptido, AACDQRVLVRR (SEC ID n°: 25), produjo muy débilmente liberación de GM-CSF de TIL586. Sin embargo, este péptido no pudo sensibilizar los linfocitos B de 586EBV cargados con el péptido durante la lisis por TIL586 (Tabla 1).

TABLA 1

Identificación de péptidos sintéticos con reactividad a TIL586

Células objetivo pulsadas con péptido	TIL586	
	Liberación de GM-CSF	% de lisis específica (E:T 20:1)
Péptidos de ORF1 (gp75)		
586EBV + péptido DDREVVWPLR (SEC ID n°: 17)	<50	<10
586EBV + péptido VWPLRFFNR (SEC ID n°: 18)	<50	<10
586EBV + péptido SGHNCGTGR (SEC ID n°: 19)	<50	<10
586EBV + péptido CGTCRPGWR (SEC ID n°: 20)	<50	<10
586EBV + péptido ACDQRVLVIR (SEC ID n°: 21)	<50	<10
586EBV + péptido ACDQRVLVIRR (SEC ID n°: 22)	<50	<10
586EBV + péptido LWDVPSWLER (SEC ID n°: 23)	<50	<10
586EBV + péptido AISQDTTVGR (SEC ID n°: 24)	<50	<10
586EBV + péptido AACDQRVLVIR (SEC ID n°: 25)	<50	<10
586EBV + péptido DQRVLVIRR (SEC ID n°: 26)	<50	<10
586EBV + péptido IVRRNLLDLSK (SEC ID n°: 27)	>5000	45
586EBV + péptido LSKEEKNHFVR (SEC ID n°: 28)		
586EBV + ninguno		
586mel + ninguno		

Se incubaron células 586EBV con un péptido individual a una concentración de 1 µg/ml durante 90 min. Se midió la liberación GM-CSF después de la incubación conjunta de las células 586EBV cargadas con péptido con TIL586. Se sustrajo la secreción de GM-CSF por TIL586 solas sin estimulación. 586EBV fue una línea celular B transformada por EBV que expresa HLA-A-31. La lisis citotóxica de 586EBV pulsada por péptidos por TIL586 se realizó en un ensayo de liberación de cromo en 4 h.

Debido a que este péptido estimulaba débilmente la liberación de citocina de TIL586 únicamente cuando se incubaba con linfocitos B de 586EBV en grandes concentraciones ($>1 \mu\text{g/ml}$) y no sensibilizaba las células objetivos para la lisis por TIL586 incluso a una concentración de $10 \mu\text{g/ml}$ de péptido (datos no mostrados), puede no representar el epítipo del linfocito T predominante reconocido por TIL586.

Para definir además a zona que contiene el epítipo del linfocito T predominante, se construyeron dos plásmidos adicionales que contienen fragmentos de PCR amplificados por cebadores GPF1, GPE1 y GPE2, respectivamente (Fig. 3A). Tal como se muestra en la Fig. 3B, ambos plásmidos que contienen un codón de inicio ATG en el principio del fragmento de PCR más pequeño confirió la capacidad de estimular la liberación de citocina por TIL586 junto con HLA-A31, lo que sugiere que el epítipo reconocido por los linfocitos T estaba codificado dentro de una secuencia de 82 nucleótidos entre las bases 247 y 329 del ADNc de gp75. Se sintetizaron treinta y ocho péptidos solapantes (nonámeros o decámeros) en ORF1 basados en la secuencia de aminoácidos de gp75 en esta zona, pero no se observó que ninguno estimulase la liberación de GM-CSF o a los linfocitos B de 586EBV sensibles a la lisis por TIL586 (datos no mostrados).

Ejemplo 3

Péptidos antigénicos procedentes de la traducción de un marco de lectura abierto alternativo del gen gp75

La ineficacia para identificar un epítipo reconocido por TIL586 en esta pequeña zona sugirió que los marcos de lectura abiertos alternativos pueden ser traducidos. Dos codones ATG en el contexto relativamente bueno estaban presentes en esta zona (nucleótidos 247 a 442) en diferentes marcos de lectura abiertos en comparación con el marco de lectura abierto de gp75 (ORF1) (Fig. 2). La traducción del primer ATG (251 GAGATGA257) (SEC ID n°: 29) produjo un marco de lectura abierto que codifica 45 aminoácidos (ORF2) mientras que el inicio de la traducción desde el ATG situado entre los nucleótidos 294 a 296 (GACATGT) (SEC ID n°: 30) generó un producto génico de 24 aminoácidos (ORF3) (Fig. 2). Se seleccionaron y sintetizaron tres péptidos procedentes de ORF2 y dos péptidos de ORF3 sobre la base del motivo de unión a HLA-A31 (Tabla 2 y Fig. 2). Sorprendentemente, un péptido MSLQRQFLR (SEC ID n°: 9) (denominado ORF3P) que procede de ORF3 fue reconocido intensamente por TIL586 cuando se pulsó en los linfocitos B de 586EBV (Tabla 2). El reconocimiento del péptido ORF3P (MSLQRQFLR) (SEC ID n°: 9) por TIL586 se observó solamente cuando el péptido se pulsó en linfocitos de B 586EBV autólogos y linfocitos B (A31+) de 1510EBV, pero no cuando el péptido era cargado en linfocitos T2 (sin HLA-A31) (Fig. 4A), lo que sugiere que el reconocimiento de este péptido por TIL586 estaba restringido por HLA-A31. La masa de péptido de ORF3P se confirmó por análisis espectrométrico de masas. Como se muestra en la Fig. 4B, TIL586 lisó linfocitos B de 586EBV pulsados con el péptido ORF3P, pero no pudo lisar los linfocitos B de 586EBV pulsados con péptido improcedente que cumplen el criterio del motivo de unión al péptido de HLA-A31, pero no son reconocidos por TIL586 o por los linfocitos T2 pulsados con el péptido ORF3P. La sensibilización para la lisis por el péptido mostró el efecto máximo a 100 nM , mediante actividad lítica se detectó incluso a una concentración de péptido de 1 nM (Fig. 4C). TIL586 no reconoció los péptidos MSLQRQFLRT (SEC ID n°: 33) ni SLQRQFLRT (SEC ID n°: 34), o los péptidos modificados (sustitución de restos anclados en las posiciones 2, 6 y 9) MLLQRQFLR (SEC ID n°: 36), MRLQRQFLR (SEC ID n°: 37), MSLQRLFLR (SEC ID n°: 38), MSLQRQFLE (SEC ID n°: 39), MSLQRQFLK (SEC ID n°: 40), procedentes de MSLQRQFLR (SEC ID n°: 9) (Tabla 2). TIL586 solo reconoció el péptido MALQRQFLR (SEC ID n°: 35) con una sustitución Ser por Ala en la posición 2 comparado con el péptido MSLQRQFLR (SEC ID n°: 9) (Tabla 2).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Identificación de péptidos antigénicos con reactividad a TIL586

Células objetivo pulsadas con péptido	TIL586	
	Liberación de GM-CSF	% de lisis específica (E:T 20:1)
Experimento A		
Péptidos derivados de ORF2		
586EBV + péptido ISQDTTVGR (SEC ID n°: 31)	<50	<10
586EBV + péptido AISQDTTVGR (SEC ID n°: 24)	<50	<10
586EBV + péptido AGEELPVTR (SEC ID n°: 32)	<50	<10
Péptidos derivados de ORF3		
586EBV + péptido LWDVPSWLER (SEC ID n°: 23)	<50	<10
586EBV + péptido MSLQRQFLR (SEC ID n°: 9)	>8000	60
586EBV + ninguno	<50	<10
586mel + ninguno	>5000	47
Experimento B		
Péptidos modificados de MSLQRQFLR		
586EBV + péptido MSLQRQFLR (SEC ID n°: 9)	>8000	63
586EBV + péptido MSLQRQFLRT (SEC ID n°: 33)	<50	<10
586EBV + péptido SLQRQFLRT (SEC ID n°: 34)	<50	<10
586EBV + péptido MALQRQFLR (SEC ID n°: 35)	>5000	54
586EBV + péptido MLLQRQFLR (SEC ID n°: 36)	<50	<10
586EBV + péptido MRLQRQFLR (SEC ID n°: 37)	<50	<10
586EBV + péptido MSLQRQLFLR (SEC ID n°: 38)	<50	<10
586EBV + péptido MSLQRQFLE (SEC ID n°: 39)	<50	<10
586EBV + péptido MSLQRQFLK (SEC ID n°: 40)	<50	<10
586EBV + ninguno	<50	<10
586mel + ninguno	>5000	48

Las condiciones para la incubación del péptido con linfocitos B de 586EBV y la prueba de liberación de GM-CSF fueron las mismas descritas en la Tabla 1. Se sustrajo la secreción de GM-CSF por TIL586 solo sin estimulantes. Los péptidos modificados se prepararon por sustitución de los aminoácidos en las posiciones 2, 6 y 9 correspondientes a MSLQRQFLR (Sec. ID n°: 9). La lisis citotóxica de 586EBV pulsado por el péptido por TIL586 se realizó en una prueba de liberación de cromo en 4 h.

Ejemplo 3

La traducción es necesaria para generar el péptido antigénico procesado naturalmente

Ya que existía un codón de terminación TAG (288-290) situado en los seis nucleótidos corriente arriba del codón de inicio ATG de ORF3 (294-296) (fig. 2), era poco probable que el péptido ORF3P procediese de un desplazamiento del marco de lectura. El análisis de la secuencia de ADN también confirmó que no existía ninguna delección o inserción en la zona corriente arriba. Para investigar si el ATG situado en los nucleótidos 294-296 jugaban un papel importante en la traducción del producto de 24 aminoácidos, ATGT (294-297) se mutó en ATCT (294-297) para eliminar la traducción de ORF3, que produciría un cambio de Cys (UGU) a Ser (UCU) en ORF1 (gp75) (Fig. 3A). Se analizó la capacidad para conferir reconocimiento por TIL586 de un plásmido que contiene el gen mutado (pGFMUT1) cuando se transfectaba conjuntamente con COS-7 junto con el ADNc de HLA-A31. La Fig. 3B demostró que el gen mutado perdía completamente la capacidad de que TIL586 estimulara la liberación de GM-CSF en comparación con la construcción que contiene el gen natural. Esta observación indicaba que se necesitaba ATG en ORF3 en las posiciones 294 a 296 del nucleótido para la traducción del producto de 24 aminoácidos y por consiguiente era esencial para generar el epítipo del linfocito T reconocido por TIL586.

Ya que el Met (ATG) está en la posición 1 del epítipo del péptido y la mutación de ATG en ATC en los nucleótidos 294 a 296 produjo un cambio de Met a Ile en la posición 1 del péptido, se investigó la posibilidad de que la pérdida de reconocimiento del gen mutado por TIL586 pudiera ser debida a la pérdida de capacidad del péptido mutado para unirse a las moléculas MHC de clase I. Se preparó un péptido sintético (ISLQRQPLR) (SEC ID n°: 41) con la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por el gen mutado y se probó el reconocimiento por TIL586. Se observó que el péptido mutado sintético era reconocido todavía por TIL586 en concentraciones comparables a las del péptido natural. Además, cuando se introducía la misma mutación en el ADNc completo, no se observó ninguna reactividad con TIL586, mientras que el ADNc natural era capaz de estimular la liberación por citocina de TIL586 a una concentración similar a la del pPCR110. Esto está de acuerdo con los datos de la delección, que indican que TIL586 no reconocía el/los péptido(s) en otras zonas del gen. Estos resultados sugieren que la pérdida de reconocimiento del gen mutado (ATG en ATC en los nucleótidos 294 a 296) por los linfocitos T era debida a la inactivación del inicio de la traducción de ORF3.

Ejemplo 4

Reconocimiento del péptido antigénico en células tumorales así como en melanocitos

Para estudiar la cuestión de si TIL586 reconocía un péptido procesado naturalmente que es similar o idéntico al péptido ORF3P en las células tumorales, se examinó la capacidad de los linfocitos B de 586EBV pulsados con el péptido ORF3P para inhibir la lisis de 586 mel marcado con ^{51}Cr en una prueba de inhalación del objetivo frío. Se observó inhibición significativa de la lisis de 586 mel marcado por ^{51}Cr por los linfocitos B de 586EBV pulsados con el péptido ORF3P pero no con los linfocitos B de 586EBV pulsados con péptido improcedente o con los linfocitos T2 pulsados con el péptido ORF3P (Fig. 5A), lo que indica que este epítipo era capaz de competir con un péptido procesado naturalmente en las células tumorales para reconocimiento de linfocitos T. Como estaba previsto, los linfocitos B de 586EBV cargados con ORF3P no inhibieron la lisis de 624 mel objetivo por TIL1200, que reconoce el antígeno de gp100 en el contexto de HLA-A2, comparado con B de 586EBV solo (Fig. 5B). Para probar además si los clones de linfocitos T pueden reconocer tanto los linfocitos B de 586EBV pulsados por el péptido ORF3P como las líneas celulares tumorales, se generaron clones de linfocitos T a partir de la línea celular de TIL586 por dilución limitante (1 célula/pocillo en una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos) y se extendieron además en el cultivo. Se generaron clones de linfocitos T por dilución limitante (1 célula por pocillo) a partir de la línea celular de TIL586. Los clones de linfocitos T se extendieron además en un medio AIM-V conteniendo 6000 IU/ml de IL-2. Los linfocitos B de 586EBV se pulsaron con el péptido ORF3P o con el péptido improcedente durante 90 min a 37°C. Después de lavar tres veces, se añadieron clones de linfocitos T o células TIL586 y se incubaron conjuntamente durante 18 a 24 h más. Para los tumores de células 586 mel, 397 mel/A31⁺ y NHEM680 de melanocitos, se incubaron 1×10^5 células por pocillo con 1×10^5 células para los clones de linfocitos T, TIL586-C1 (Fig. 6A), TIL586-C4 (Fig. 6B) y TIL586-C6 (Fig. 6C) o TIL586 (Fig. 6D) durante 18 a 24 h, respectivamente. Se realizó el ensayo de GM-CSF como se describe en la Fig. 1B. Seis clones de linfocitos T fueron capaces de reconocer células tumorales 586 mel, linfocitos B de 586EBV pulsados con el péptido ORF3P y melanocitos positivos HLA-A31, pero no 397 mel/A31 o linfocitos B de 586EBV solos. Los datos representativos se muestran en las Figuras 6A a 6D. Estos resultados sugirieron que los clones de linfocitos T probablemente reconocieron un péptido procesado naturalmente bien similar o idéntico al péptido ORF3P en células tumorales y melanocitos normales.

Ya que existe una identidad en la secuencia de aminoácidos del 40 al 45% de gp75 con tirosinasa, gp100 y TRP-2, se probó la posibilidad de que el péptido reconocido por los clones de linfocitos T no provenga de gp75, sino de una de estas otras proteínas. Se transfectaron células COS-7 con HLA-A31 más tirosinasa, gp100 o ADNc de TRP-2, respectivamente, y se observó que ninguna podía ser reconocida por los seis clones T mientras que las HLA-A31 y ADNc de gp75 transfectados por COS-7 estimularon la liberación de GM-CSF procedente de estos clones (datos no mostrados). Una búsqueda en la base de datos de ordenador indicó que ninguna de las proteínas conocidas incluyendo la tirosinasa, gp100 y TRP-2 en la base de datos contenía secuencias de aminoácidos con el motivo de fijación al péptido de HLA-A31 y una similitud importante con el epítipo del péptido reconocido por TIL586.

Ejemplo 5

Ensayo de protección in vivo

Para los estudios de protección *in vivo*, se inmunizaron ratones transgénicos MHL-A31⁺ con 0, 1 pg, 1 ng, 1 μg , 1 mg ó 100 mg del péptido del cáncer (SEC ID n°: 9), por vía intravenosa el día cero y el día 14 antes de una prueba de provocación subcutánea con 10^4 células de melanoma de ratón Trp-1⁺ B16 o una prueba de provocación intravenosa con 5×10^5 células de melanoma de ratón Trp-2⁺ B16. Los ratones que recibieron células tumorales por vía subcutánea se les observó dos veces a la semana el desarrollo del tumor y se determinó su tamaño. Los ratones que recibieron células tumorales por vía intravenosa se les practicó la eutanasia el día 12 y se determinó el número de metástasis pulmonares según describió Houghton, A.N. 1994 *J. Exp. Med.* 180:1-40.

Ejemplo 6

Ensayo de tratamiento in vivo

Para el tratamiento *in vivo* se hizo una prueba de provocación en ratones transgénicos MHL-A31⁺ bien con 1×10^5 ó 5×10^5 células de melanoma de ratón Trp-1⁺ B16 por vía intravenosa para establecer la metástasis pulmonar. Se vacunaron posteriormente los ratones con un virus recombinante que expresa el péptido del cáncer (SEC ID n°: 9) en 10^5 PFU/mg de peso corporal. Se practicó la eutanasia a los ratones el día 12 y se determinó el número de metástasis pulmonares en los ratones vacunados frente a los no vacunados.

Ejemplo 7

Linfocitos T específicos del antígeno del cáncer Inmunoterapia

Linfocitos T sensibilizados previamente con un antígeno de melanoma pueden ser eficaces para tratar terapéuticamente mamíferos afectados de melanoma. Se aíslan linfocitos T de la sangre periférica o de suspensiones tumorales de melanoma y se cultivan *in vitro* (Kawakami, Y. *et al*, 1988, *J. Exp. Med.* 168:2183-2191).

Los linfocitos T están expuestos al péptido del cáncer (SEC ID nº: 6) en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ solos o en presencia de IL-2, resensibilizados y sembrados en el cultivo. Los linfocitos T expuestos al péptido del cáncer se administran a un mamífero a razón de aproximadamente 10^9 a 10^{12} linfocitos por mamífero. Los linfocitos se administran bien por vía intravenosa, por vía intraperitoneal o por vía intralesional. El tratamiento se puede administrar simultáneamente con otros tratamientos terapéuticos tales como citocinas, excisión quirúrgica o lesiones de melanoma y fármacos quimioterapéuticos.

Ejemplo 8

10 Tratamiento de pacientes con melanoma metastásico

En este protocolo, se inmuniza a los pacientes con melanoma avanzado con un epítipo antigénico del cáncer.

Los pacientes seleccionables para la prueba deben presentar pruebas de melanoma metastásico mensurables o evaluables en las que haya fracasado la terapia eficaz habitual. Los pacientes deben tener tumores que expresen el antígeno de TPI-1 probado por PCR o por análisis de transferencia de Northern o ARN de células tumorales.

Los pacientes reciben 1 ng, 1 μg , 1 mg ó 500 mg/kg de peso corporal de un péptido del cáncer (SEC ID nº: 6) por vía intravenosa el día cero, el día 7 y el día 14 solo o en combinación con IL2 y/o una molécula inmunoestimulante. Se evalúa la toxicidad, efectos inmunológicos y la eficacia terapéutica en los pacientes.

En los linfocitos extraídos de los pacientes tratados se prueba la respuesta específica al antígeno del cáncer que comprende la secuencia de aminoácidos MSLQRQFLR (SEC ID nº: 6).

Se define una respuesta completa como la desaparición de toda prueba clínica de enfermedad que termina al menos en cuatro semanas. Una respuesta parcial es una disminución del 50% o mayor en la suma de los productos del diámetro perpendicular de todas las lesiones mensurables durante al menos cuatro semanas sin aparición de nuevas lesiones o aumento en alguna de las lesiones. Las respuestas menores se definen como la disminución del 25 al 49% en la suma de los productos del diámetro perpendicular de todas las lesiones mensurables durante al menos cuatro semanas sin aparición de nuevas lesiones o aumento en alguna de las lesiones. Cualquier paciente con menos de una respuesta parcial se considera que no responde al tratamiento. La aparición de nuevas lesiones o mayores del 25% de aumento en el producto de los diámetros perpendiculares de las lesiones anteriores después de una respuesta parcial o completa se considera una recaída.

35 Ejemplo 9

Materiales y procedimientos para TRP-2

Productos químicos y reactivos

Los siguientes productos químicos y reactivos se adquirieron a los proveedores indicados: RPMI1640, medio AIM-V, Lipofectamina, G418 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD); vector de expresión eucariótica pCR3 (Invitrogen, San Diego, CA); anticuerpo monoclonal anti-HLA-A31 (One lambda, Canoga Park, CA); anticuerpo de anti-inmunoglobulina M conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

Clones y líneas celulares de linfocitos T

Se generaron clones de linfocitos T por procedimientos de dilución limitante (a razón de 1 célula/pocillo) procedentes de la línea celular TIL586 y se utilizaron PBL alógenos (1×10^3 células/pocillo) como células nutridoras en RPMI1640 conteniendo suero AB humano al 10% y 500 IU de IL-2. Después de 12 días, se sembraron a continuación clones de linfocitos T en un medio AIM-V conteniendo 6000 IU/ml de IL-2. Para obtener una expansión óptima, se utilizó el procedimiento de expansión de OKT3 descrito por S. Riddell (Walter *et al.* 1995 *N. Engl. J. Med.* 333:1038-1044). En resumen, el día 0, se cultivaron 5×10^4 a 5×10^5 linfocitos T junto con HLA-A31 PBL (relación PBL:linfocitos, T500:1) y linfocitos B de 586EBV (relación EBV:linfocitos T, 100:1) en 25 ml de RPMI 1640 conteniendo suero humano al 11%, 30 ng/ml de anticuerpo OKT3 y antibióticos. El día 1, se añadió IL-2 a una concentración final de 180 IU/ml. Se cambió el medio por medio reciente conteniendo suero humano al 11%, 180 IU/ml de IL-2 el día 5. Se cambiaron a continuación los medios cada tres días. Los días 12 a 14, se recogieron los linfocitos T, se hizo el recuento y se conservaron en el congelador. Se aislaron TIL586 de la muestra tumoral de un paciente con melanoma metastásico y se cultivaron en un medio conteniendo IL-2 (6000 IU/ml) (Chiron) durante 32 a 60 días como se describió anteriormente (Topalian *et al.* 1988, *J. Clin. Oncol.* 6:839-853). TIL586 eran principalmente linfocitos T de CD8⁺.

Las líneas celulares de melanoma 397 mel, 397 mel/A31, 586 mel, 624 mel, 624 mel/A31 y las líneas celulares de linfocitos B transformadas por EBV 586EBV y 1510EBV fueron creadas en nuestro laboratorio y cultivadas en medio RPMI 1640 conteniendo suero de ternero fetal al 10% (FCS). Melanocitos normales cultivados procedentes del propicio de un bebé (NHEM680 adquiridos en Clonetics, CA) se cultivaron en medio de cultivo de melanocitos (MOM; Clonetics, CA). La línea celular de COS-7 fue proporcionada por el Dr. W. Leonard (NIH).

Ensayo de secreción de GM-CSF

Se realizaron ensayos de transfección de ADN y de GM-CSF como se indicó anteriormente (Wang *et al.* 1995, *J. Exp. Med.* 181:799-804). En resumen, se mezclaron 200 ng de ADN que codifica antígenos y 50 ng del ADN de HLA-A31 con 2 μ l de lipofectamina en 100 ml de DMEM durante 15 a 45 min. La mezcla de ADN/lipofectamina se añadió a continuación a las células de COS-7 (5×10^4) y se incubaron toda la noche. Al día siguiente, se lavaron las células dos veces con medio DMEM. Se añadió TIL586 a una concentración de 1×10^5 células/pocillo en un medio de AIM-V conteniendo 120 IU/ml de IL-2 para los clones de los linfocitos T, se añadieron únicamente $1-2 \times 10^4$ células/pocillo. Después de 18 a 24 h de incubación, se recogieron 100 μ l de sobrenadante y se midió GM-CSF en un análisis ELISA estándar (R + D Systems, Minneapolis, MN). Para el reconocimiento de los péptidos de la prueba, se incubaron células 586EBV o linfocitos T2 con péptidos a 37°C durante 90 min y a continuación se lavaron tres veces con medio AIM-V conteniendo 120 IU/ml de IL-2. Se añadieron linfocitos T y se incubaron durante 18 a 24 h más, se recogió 10 μ l de sobrenadante para el ensayo de GM-CSF.

Construcciones de delección de Exo III/5I y subclonación

El ADNc de TRP-2 fue una donación del Dr. Shibahara (Yokoyama *et al.* 1994, *Biochim. Biophys. Acta* 1217:317-321) y se subclonó en el vector de pCR3 con un activador para la expresión de CMV. Para preparar una serie de delecciones, se dirigió el plásmido pCR3 que contiene ADNc de TRP-2 con Xba I y se relleno con trifosfatos de alfa-fosforotioato desoxirribonucleótido para bloquear la digestión de la Exo III nucleasa. El ADN linealizado se sometió a la digestión del segundo enzima de restricción para generar un extremo sensible a Exo III. La delección de Exo III nucleasa/nucleasa de la alubia de Mung se realizó según las instrucciones del fabricante (Stratagene, CA). Se secuenciaron todas las construcciones de delección para determinar la situación de la secuencia de ADN que se elimina. El plásmido pTA fue un derivado de pCR3-TRP2, en el que se eliminó un fragmento de ADN de Apa I procedente del extremo 3' del gen TRP-2. pTK fue creado después de la eliminación de un fragmento de ADN de KpnI procedente del extremo 3' del gen TRP-2. Se generó pTP eliminando un fragmento Pst I interno y religadura.

Análisis de transferencia de Northern

Se aisló ARN completo por el procedimiento de centrifugación de isocianato de guanidina/cloruro de cesio. El ARN completo del tejido normal humano se adquirió en Clontech, CA. Se sometieron a electroforesis veinte μ g de ARN completo en 1,2% gel de agarosa formaldehído y se transfirieron a una membrana de nilón. Se marcó un fragmento de ADN de 2,0 kb del gen TRP-2 con 32 P- α -CTP por el procedimiento de cebado al azar. Se realizó la prehibridación y la hibridación según el protocolo QuickHyb (Stratagene). Se lavaron dos veces las membranas con 2 X SSC/SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 15 min y dos veces con 0,1 X SSC/SDS al 0,1% a 60°C durante 30 min. Se realizó la autorradiografía a -70°C.

Pruebas de citotoxicidad

Se determinó la citólisis utilizando Calcein AM (Molecular Probes, Eugene, OR). En resumen, se pulsaron linfocitos T2 o B 586EBV con péptidos en RPMI1640/FCS al 5% durante 90 min. Las células tumorales y los linfocitos B EBV pulsados por el péptido se marcaron con Calcein AM (15 μ l de 1 mg/ml de Calcein AM por cada 1×10^6 células) durante 30 min a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con AIMV/120 IU de IL-2. Se mezclaron 1×10^3 células objetivo con linfocitos T en varias proporciones E:T. Después de 4 h de incubación a 37°C, se añadió 5 μ l de solución de hemoglobina bovina enfriada bruscamente conteniendo bromuro de etidio. Se leyó la placa por ecografía Lambda. Se calculó el porcentaje de lisis a partir de la siguiente ecuación: $[1-(A-B)/(C-B)] \times 100$, en la que A es la lectura de las células no lisadas en presencia de linfocitos T, B es el valor de la señal de fondo y C es el valor de la señal máxima de las células objetivo.

Se sintetizaron los péptidos por un procedimiento en fase sólida utilizando un sintetizador de péptidos (modelo AMS 422, Gilson Co., Inc., Worthington, OH). Se purificaron algunos péptidos por HPLC y presentaron una pureza mayor del 98%. Se confirmó la masa de péptidos de algunos péptidos por análisis de espectrometría de masas.

Ejemplo 10

Reconocimiento de nuevos antígenos en células tumorales por clones de CTL

En los estudios anteriores, se ha aislado un número de clones de linfocitos T a partir de la línea celular de TIL586 por el procedimiento de dilución limitante (Wang *et al.* antes de 1996, *J. Exp. Med.* 183:1131-1140). Entre ellos, seis clones reconocieron los linfocitos B de 586EBV pulsados con el péptido ORF3P procedente de un producto génico traducido a partir de un marco de lectura abierto alternativo del gen TRP-1/gp75 y de las células tumorales de 586 mel autólogo, pero no reconocieron los linfocitos B de 586EBV pulsados con un péptido impropio. Se seleccionó TIL586-C1 como un representante para estos clones de linfocitos T como se muestra en la Fig. 7. Sin embargo, varios clones de linfocitos T aislados de la misma línea celular de TIL586 no reconocieron ni los linfocitos B de 586EBV con

el péptido ORF3P de TRP-1 ni con las células COS transfectadas con TRP-1 y los ADNc de HLA-A31, pero fueron capaces de reconocer 586 mel así como HLA-A31 + melanocitos (Fig. 7). Estos resultados sugirieron que estos clones de linfocitos T reconocieron los antígenos tumorales adicionales en las células tumorales 586 mel. Se sembraron a continuación estos clones de linfocitos T para obtener suficientes células para la identificación de bibliotecas de ADNc o análisis de otros ADNc para reconocimiento por los procedimientos descritos en el apartado Materiales y Procedimientos (Ejemplo 9). Uno de los clones, el clon 4 de CTL, se extendió con éxito y se utilizó para estudios posteriores como se describe más adelante.

Ejemplo 11

Identificación de un ADNc que codifica un antígeno tumoral reconocido por clones de linfocitos T

Para determinar la molécula de HLA responsable de presentar el antígeno al clon 4 de CTL, se transfirió ADNc de HLA-A31 a líneas tumorales negativas para A31 tales como 397 mel y 624 mel y se examinaron para reconocimiento por el clon de CTL. Los transfectantes de 397 mel y 624 mel que expresan HLA-A31 fueron significativamente reconocidos por el clon 4 de CTL (Tabla 3). Además, estos linfocitos T fueron también capaces de reconocer a 1353 mel de la línea tumoral alógena positiva a HLA-A31, indicando que el reconocimiento del antígeno tumoral por el clon 4 de CTL estaba restringido por HLA-A31.

TABLA 3

La secreción específica de GM-CSF por el clon 4 de CTL está restringida por HLA-A31

Líneas celulares	Gen transfectado	Estimulantes	
		Expresión de HLA-A31	Secreción de GM-CSF (pg/ml)
Ninguna	ninguno		<10
397mel		ninguna	23
(TRP1-/TRP2+)			
397mel	HLA-A31	+	2840
(TRP1-/TRP2+)			
624mel	ninguno	-	39
(TRP1+/TRP2+)			
624mel	HLA-A31	+	670
(TRP1+/TRP2+)			
1353mel	ninguno	+	879
(TRP1+/TRP2+)			
586mel	ninguno	+	>4000
(TRP1+/TRP2+)			
586EBVB	ninguno	+	29
COS-7	ninguno	-	35
COS-7	HLA-A31	+	30

Se midió GM-CSF en el sobrenadante después de 24 h de incubación de 2×10^4 células del clon 4 de CTL con líneas celulares de melanoma o COS-7 transfectadas con ADNc de HLA-A31.

Ya que solamente estaban disponibles un número limitado de linfocitos T, se probó en primer lugar si estos linfocitos T reconocidos previamente identificaban o no antígenos tumorales o proteínas de diferenciación del linaje de melanocitos. Se probó el reconocimiento de las células COS-7 transfectadas con ADNc de HLA-A31 y los genes que codifican los antígenos tumorales conocidos o antígenos supuestos incluyendo MART 1 (Kawakami, *et al.*, después de 1994, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3515-3519), gp75 (Wang *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.*, 181:799-804), gp100 (Kawakami *et al.*, antes de 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:6458-6462), tirosinasa (Brichard *et al.* 1993, *J. Exp. Med.* 178:489-495), p1S (Robbins *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154:5944-5950) y TRP2 (Yokoyama *et al.* 1994, *Biochim. Biophys. Acta* 1217:317-321; Bouchard *et al.* 1994, *Eur. J. Biochem.* 219:127-134) por el clon 4 de CTL. Las células COS transfectadas con HLA-A31 solas o TRP-2 solas no confieren reconocimiento por los clones de linfocitos T. Sin embargo, las células COS transfectadas con HLA-A31 y ADNc de TRP-2 estimularon la liberación de GM-CSF de los linfocitos T, mientras que las células COS transfectadas con HLA-A31 y otros genes que no indican que el clon 4 de los linfocitos T reconocieron TRP-2 como antígeno tumoral de un modo restringido por HLA-A31.

El análisis de similitudes estructurales en HLA-A3, A11, A31, A33 y A68 y su motivo de fijación al péptido ha sugerido la existencia del supermotivo de tipo A3 (Sidney *et al.* 1996, *Human Immunol.*, 45:79-93). Un solo péptido del epítipo podría interaccionar con las moléculas HLA-A3, A11, A31, A33 y A68 que se expresan acumuladamente en aproximadamente el 40 al 50% de la población general. Se ha publicado que el mismo epítipo del péptido procedente de la proteína nucleocápsida del virus de la Hepatitis B podría ser presentado por HLA-A31 y por moléculas -A68 y ser reconocido por el correspondiente CTL restringido por HLA-A31 o -A68 (Missale *et al.*, 1993, *J. Exp. Med.*, 177:751-762). Se probó si los linfocitos T restringidos por HLA-A31 reconocían los epítipos de TRP-1 y TRP-2 cuando se pulsaban sobre linfocitos B de EBV positivos a HLA-A3. Convenientemente, se detectó un reconocimiento débil basado en la liberación de GM-CSF procedente de los linfocitos T. Sin embargo, no se detectó ningún reconocimiento de células tumorales positivas a HLA-A3.

Ejemplo 12

Expresión del gen de TRP-2

Se realizaron análisis de transferencia de Northern utilizando ADNc de TRP-2 como sonda para evaluar el modelo de expresión de TRP-2 en diferentes tejidos. El tejido retiniano normal demostró ser el único positivo para la expresión de TRP-2 entre los tejidos humanos normales probados. El modelo de expresión de TRP-2 en las líneas celulares de melanoma y de otras líneas celulares se relaciona a continuación en la Tabla 4. Se observó que veinticinco de treinta líneas celulares de melanoma expresan TRP-2. La línea Daudi del linfocito B de Burkitt y la línea celular MDA231 del cáncer de mama fueron negativas, de acuerdo con los resultados anteriores (Bouchard *et al.* 1994, *Eur. J. Biochem.* 219:127-134). De este modo, igual que tirosinasa, TRP-1, gp100 y MART-1, el modelo de expresión de este gen parecía que estaba restringido a los melanomas, líneas celulares de melanocitos normales y a la retina.

TABLA 4

Expresión de TRP-2 en diferentes líneas celulares y tejidos humanos probados

<u>Líneas celulares de</u>	<u>Expresión de</u>	<u>Líneas celulares/tejidos</u>	<u>Expresión de</u>
<u>melanoma</u>	<u>TRP-2</u>		<u>TRP-2</u>
397mel	+	A375	-
526mel	+	586EBVB	-
397mel	+	<u>Melanocitos</u>	
501mel	+	FM906	+
537mel	-	FM680	+
553Bmel	+		
586mel	+	<u>Otras líneas tumorales</u>	
624mel	+	Daudi	-
677mel	+	MDA231	-
679mel	-		
697mel	+	<u>Tejidos normales</u>	
729mel	-	Retina	+
894mel	+	Testículos	-
836mel	-	Cerebro	-
888mel	+	Bazo	-
928mel	+	Hígado	-
1290mel	+	Hígado fetal	-
1300mel	+	Timo	-
952mel	+	Pulmones	-
HT144mel	+		
1011mel	+		
1088mel	+		
SK23	+		
SK28	+		
Maisel	+		
groves	+		
WN266	+		

Se analizó la expresión de TRP-2 por análisis de transferencia de Northern con ~ 10 a 20 g de ARN completo y se sondaron con fragmento de ADNc de TRP-2. Daudi es una línea de linfocitos B de Burkitt y MDA231 es una línea celular de cáncer de mama.

Ejemplo 13

Epítomos del péptido reconocidos por linfocitos T

Para determinar los epítomos antigénicos de TRP-2, se generaron una serie de delecciones anidadas del gen TRP-2 a partir del extremo 3' utilizando nucleasa Exo III/S1 así como fragmentos de ADN que codifican la forma truncada de TRP-2. Estas delecciones y construcciones subclonadas se transfirieron a las células COS-7 junto con el plásmido pBK-CMV que contiene el ADNc de HLA-A31. El reconocimiento de las células COS transfectadas se probó con el clon de CTL midiendo la liberación de citocina de GM-CSF procedente del clon CTL. La Fig. 9 indicaba que las construcciones pTD1, 2 y 3 conservaban la capacidad para estimular la liberación de citocina en el clon 4 de CTL, pero pTD4 y pDT5 perdieron la actividad estimulante para el clon 4 de CTL, lo que indica que el/los epítopo(s) reconocido(s) por el clon 4 de CTL estaba(n) situado(s) en la zona de los nucleótidos 836 a 1045. Esto era coherente con los resultados obtenidos en los experimentos de subclonación. Aunque pTA y pTP perdieron la capacidad para estimular la liberación de citocina en el clon 4 de CTL, pTK se mantiene todavía positivo en el ensayo de liberación de citocina. Por consiguiente, los epítomos residían en un fragmento de ADN flanqueados por las zonas PstI y KpnI como se muestra en la Fig. 10.

Para identificar los epítomos de la zona de codificación de este pequeño fragmento de ADN, cinco péptidos sintéticos se basaron en el motivo de fijación al péptido sintetizado para HLA-A31 (restos hidrófobos en la posición 2 y restos cargados positivamente en la posición 9) (Rammensee *et al.* 1995, *Immunogenetics* 41:178-228). Estos péptidos fueron pulsados en linfocitos B de 586EBV y se probó la capacidad del clon 4 de CTL para estimular la liberación de citocina. Tal como se muestra en la Tabla 5, el péptido TRP₁₉₇₋₂₀₅ fue firmemente reconocido por el clon 4 de CTL cuando se pulsó en los linfocitos B de 586EBV. El reconocimiento de este péptido por el clon 4 de CTL se observó solamente cuando se pulsó el péptido en los linfocitos B de HLA-A31 + EBV tal como 586EBV y 1510 EBV, pero no en los linfocitos T2 negativos para HLA-A31. El clon 4 de CTL no era el péptido ORF3P procedente del marco de lectura abierto alternativo del gen TRP-1. Estos resultados demostraron que TIL586-C1 reconocía específicamente el péptido ORF3P procedente de TRP-1 y el clon 4 de CTL reconocía específicamente el péptido procedente de TRP2. No se observó reactividad cruzada mientras que tanto ORF3P como TRP2-p197 eran presentados a los linfocitos T por las moléculas HLA-A31.

TABLA 5

Identificación de péptidos sintéticos con reactividad para los clones de linfocitos T

35

	Células objetivo pulsadas con péptido		Liberación de GM-CSF	
			clon 1 de CTL (TRP-1)	clon 4 de CTL (TRP-2)
40	586EBV + TRP ₁₈₆₋₁₉₄	VWLHYYSVR(TRP-2)	<50	<50
	586EBV + TRP ₁₈₅₋₁₉₄	FVWLHYYSVR(TRP-2)	<50	<50
	586EBV + TRP ₁₉₄₋₂₀₂	RDLLGPGR(TRP-2)	<50	<50
	586EBV + TRP ₁₉₇₋₂₀₅	LLGPGRPYR(TRP-2)	<50	>4000
	586EBV + TRP ₂₁₃₋₂₂₁	GPAFVTWHR(TRP-2)	<50	<50
45	586EBV + ORF3P	MSLQRQFLR(TRP-1)	>8000	<50
	1510EBV + TRP ₁₉₇₋₂₀₅	LLGPGRPYR(TRP-1)	<50	>4000
	1510EBV + ORF3P	MSLQRQFLR(TRP-1)	>6000	<50
	T2 + TRP ₁₉₇₋₂₀₅	LLGPGRPYR(TRP-2)	<50	<50
	T2 + ORF3P	MSLQRQFLR(TRP-1)	<50	<50
50	586EBV + ninguno		<50	<50
	586EBV + ninguno		>5000	>3000

Se incubaron células 586EBV con péptidos individuales a una concentración de ~1 g/ml durante 90 min. Se midió la liberación GM-CSF después de la incubación conjunta de las células 586EBV cargadas con péptido con clones de linfocitos T que reconocen TRP-1 o TRP-2. Se sustrajo la secreción de GM-CSF por los linfocitos T solos sin estimulantes. 586EBV y 1510EBV fueron líneas celulares B transformadas por EBV que expresan HLA-A31.

Ejemplo 14

60

Caracterización del péptido TRP₁₉₇₋₂₀₅

Los experimentos de valoración demostraron que 1 nM de péptido era suficiente para estimular la liberación de GM-CSF del clon 4 de los linfocitos T y la estimulación alcanzó una meseta a 500 nM (Fig. 10A). La lisis de los linfocitos B de 586EBV pulsada con TRP₁₉₇₋₂₀₅ por el clon 4 de CTL se determinó también a varias concentraciones de péptido (Fig. 10B) y como en los ensayos de liberación de citocina, la lisis de las células objetivo por el clon 4 de CTL se detectó a una concentración de péptido de 1 nM. La lisis máxima se observó a 100 nM de concentración de

péptido. El clon 4 de CTL fue capaz de lisar a 586EBV pulsadas con células tumorales TRP2-p197 y 586 mel incluso a una proporción E:T baja, pero no pudo lisar los linfocitos B de 586EBV solos o pulsados con el péptido de control ORF3P ni con la línea 397 mel negativa a HLA-A31 (Fig. 10).

La mayoría de los antígenos de melanoma humano identificados hasta la fecha son autoantígenos no mutados y el reconocimiento de los linfocitos T y la afinidad de unión de estos autopéptidos para las correspondientes moléculas MHC ha sido en algunos casos mejorada por sustitución de aminoácidos y restos de anclaje. Se prepararon numerosos péptidos sintéticos incluyendo octámeros o decámeros y péptidos modificados como se indica en la Tabla 6 y se probó su reconocimiento por el clon 4 de CTL cuando se pulsaron en los linfocitos B de 586EBV. El decámero TLLGPGRPYR, en el que un aminoácido se extendió al terminal N de TRP₁₉₇₋₂₀₅, fue reconocido todavía por el clon 4 de CTL cuando se pulsó en los linfocitos B de 586EBV, pero la reactividad fue aproximadamente el 60% de la del nonámero LLGPGRPYR solapante. Basándose en el motivo de unión de HLA-A31, se generaron unos péptidos poco modificados con sustitución de aminoácidos en las posiciones 2 y 9 de los restos de anclaje así como en otras posiciones. El resto Arg en la posición 9 y el terminal C podrían ser sustituidos por el resto Lys y el péptido modificado conservó por lo menos el 60% de la actividad del péptido precursor. La sustitución de un resto de Leu en la posición 2 por restos de Ser, Ile o Val conservó la misma actividad o redujo la actividad al 60% del péptido parental mientras que la sustitución por Ala o Phe en esta posición redujo la capacidad de estimular la liberación de citocina en los linfocitos T (Tabla 6). Otras modificaciones proporcionaron actividad variable del péptido del cáncer en el reconocimiento de los linfocitos T.

TABLA 6

Comparación de reactividad de linfocitos T de péptidos modificados

Células objetivo pulsadas con péptidos	Clon 4 de CTL
	Liberación de GM-CSF
586EBV + LLGPGRPYR	3450
586EBV + TLLGPGRPYR	2100
586EBV + LLGPGRPYRA	545
586EBV + LGPGRPYR	<50
586EBV + LIGPGRPYR	2545
586EBV + LVGPGRPYR	2100
586EBV + LSGPGRPYR	3300
586EBV + LAGPGRPYR	550
586EBV + LFGPGRPYR	<50
586EBV + LLGPGRPYK	2000
586EBV + LLGPGRPYH	<50
586EBV + ALGPGRPYR	<50
586EBV + RLGPGRPYR	<50
586EBV + KLGPRPYR	420
586EBV + LLLPGRPYR	<50
586EBV + LLFPGRPYR	<50
586EBV + LLAPGRPYR	738
586EBV + LLGPGFPYR	<50
586EBV + LLGPGAPYR	<50
586EBV + LLGPGIPYR	<50
586EBV + LLGPGVPYR	321
586EBV + LLGPGKPYR	<50
586EBV	>3000
586mel	

Se incubaron células 586EBV con péptidos individuales a una concentración de ~0,5 g/ml durante 90 min. Se midió la liberación GM-CSF después de la incubación conjunta de las células 586EBV cargadas con péptido con las células CTL del clon 4. Se sustrajo la secreción de GM-CSF por los linfocitos T solos sin estimulantes. 586EBV fue una línea celular B transformada por EBV que expresa HLA-A31.

ES 2 305 379 T3

La proteína TRP-2 contiene dos supuestos sitios de fijación al cobre, zonas ricas en cisteína y un dominio de transmembrana. Se ha cartografiado el cromosoma 13 de la TRP-2 humana mientras que en la contrapartida del ratón se ha cartografiado el cromosoma 14 en la zona de mutación del color pizarroso del pelo. Existe aproximadamente una identidad de secuencia de aminoácidos del 40% entre TRP-2 y tirosinasa o TRP-1/gp75, pero no se observó ninguna línea ni clon de CTL que reconociera en alto grado un epítipo del péptido común entre la familia de proteínas de la tirosinasa.

El péptido noámero TRP₁₉₇₋₂₀₅ reconocido por el clon 4 de CTL está situado en una de las zonas de fijación al cobre en la zona de codificación de la TRP-2. Este péptido estimuló muy eficazmente la liberación de citocina de los linfocitos T en comparación con otros péptidos incluyendo los péptidos modificados probados en este estudio. Esto estaba de acuerdo con el motivo de unión a HLA-A31 previsto, lo que indica que Leu en la posición 2 y Arg en la posición 9 son los restos favorables. Aunque Leu en la posición 2 y Arg en la posición 9 podrían ser sustituidos con Ile y Ser en la posición 2 y Lys en la posición 9, respectivamente, con una pérdida pequeña o mínima de reactividad para el reconocimiento de linfocitos T, las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 1, 3 ó 6 condujeron a alguna pérdida de reactividad.

Ejemplo 15

Ensayo de tratamiento in vivo

Para el tratamiento *in vivo*, se expusieron ratones transgénicos MHL-A31⁺ a 1×10^5 ó 5×10^5 células de melanoma de ratón Trp-1⁺ B16 por vía intravenosa para crear metástasis pulmonar. Se vacunaron los ratones posteriormente con un péptido del cáncer con expresión de virus recombinante, LLGPGRPYR a 10^5 PFU/mg de peso corporal. Se practicó la eutanasia a los ratones el día 12 y se determinó el número de metástasis pulmonares en los ratones vacunados frente a ratones los no vacunados.

Ejemplo 16

Inmunoterapia de linfocitos T específicos para el antígeno del cáncer

Los linfocitos T sensibilizados previamente con un antígeno de melanoma puede ser eficaces en el tratamiento terapéutico de mamíferos afectados de melanoma. Los linfocitos T se aislan de la sangre periférica o de suspensiones tumorales de melanoma y se cultivan *in vitro* (Kawakami *et al.*, 1988, *J. Exp. Med.* 168:2183-2191).

Los linfocitos T se exponen al péptido del cáncer, LLGPGRPYR a una concentración de 1 μ g/ml solos o en presencia de IL-2, se vuelven a sensibilizar y se extienden en el cultivo. Los linfocitos T expuestos al péptido del cáncer se administran a un mamífero a razón de aproximadamente 10^9 a 10^{12} linfocitos por mamífero. Los linfocitos se administran ya sea por vía intravenosa, intraperitoneal o intralesional. El tratamiento se puede administrar simultáneamente con otros tratamientos terapéuticos tales como citocinas, excisión quirúrgica de lesiones de melanoma y fármacos quimioterapéuticos.

Ejemplo 17

Tratamiento de pacientes con melanoma metastásico

En este protocolo, se inmunizaron pacientes con melanoma avanzado con el epítipo antigénico del cáncer. Los pacientes seleccionados para la prueba deben presentar pruebas de melanoma mensurable o metastásico evaluable en los que ha fracasado la terapia eficaz estándar. Los pacientes deben presentar tumores que expresen el antígeno de TPI-2 probados por PCR o mediante análisis de transferencia de Northern del ARN de la célula tumoral.

Los pacientes reciben bien 1 ng, 1 μ g, 1 mg o 500 mg/kg de peso corporal de un péptido del cáncer LLGPGRPYR por vía intravenosa el día cero, el día 7 y el día 14 solo o en combinación con IL-2 y/o una molécula co-inmunoestimulante. Se evalúa la toxicidad, los efectos inmunológicos y la eficacia terapéutica en los pacientes.

En los linfocitos extraídos de los pacientes tratados se analiza la respuesta específica al antígeno del cáncer que comprende la secuencia de aminoácidos LLGPGRPYR.

Se define una respuesta completa como la desaparición de toda prueba clínica de enfermedad que dure al menos cuatro semanas. Una respuesta parcial es una disminución del 50% o mayor en la suma de los productos del diámetro perpendicular de todas las lesiones mensurables durante al menos cuatro semanas sin aparición de nuevas lesiones o aumento en alguna de las lesiones. Las respuestas menores se definen como la disminución del 25 al 49% en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones mensurables sin aparición de nuevas lesiones y sin aumento en alguna de las lesiones. Cualquier paciente con menos de una respuesta parcial se considera que no responde al tratamiento. La aparición de nuevas lesiones o mayores del 25% de aumento en el producto de los diámetros perpendiculares de las lesiones anteriores después de una respuesta parcial o completa se considera una recaída.

Exposición

Se han identificado varios epítomos de linfocitos T antígenicos procedentes del marco de lectura abierto normal de los correspondientes antígenos de melanoma compartidos no mutados, tales como tirosinasa, MART-1/Melan-A y gp100. En este estudio se demostró que el péptido antigénico reconocido por TIL586 procedía de un segundo producto génico del gen gp75. En nuestra opinión, éste es el primer ejemplo en que los linfocitos T reconocen un péptido antigénico procedente de la traducción de un marco de lectura abierto solapante del mismo gen y el único ejemplo en células eucarióticas en el que se pueden traducir dos proteínas y/o péptidos completamente diferentes procedentes de los marcos de lectura abiertos solapantes de un único gen celular. El ORF3 de gen gp75 codifica una proteína corta de 24 aminoácidos. El péptido antigénico reconocido por TIL586 está codificado por la secuencia situada inmediatamente detrás del codón de inicio ATG (294-296) del marco de lectura abierto alternativo.

Aunque gp75 comparte una homología de secuencia del 40 al 45% con la tirosinasa, gp100 y TRP-2, la transfección conjunta de HLA-A31 y tirosinasa, gp100 o los ADNc de TRP-2, respectivamente, en las células COS-7 fue ineficaz para estimular la liberación de GM-CSF en los clones de linfocitos T procedentes de TIL586. Una búsqueda en la base de datos no puso de manifiesto ninguna proteína que tuviera un motivo de unión al péptido HLA-A31 y la homología de secuencia importante en el epítipo del péptido reconocido por TIL586 y sus clones de los linfocitos T derivados. Además, los estudios anteriores demostraron que los transfectantes del melanoma (gp75⁺/A31⁺) confirieron la capacidad de estimular la liberación de GM-CSF procedente de TIL586, pero los transfectantes del melanoma de gp75 (gp75⁻/A31⁺) no lo hicieron (Wang R.F. *et al.*, *J. Exp. Med.* 1995, vol. 181:799-804). Similares resultados se obtuvieron con otras líneas celulares (gp75⁻/A31⁺). Ya que el péptido ORF3P fue el único epítipo identificado del gen gp75 y fue reconocido por seis clones de linfocito T procedentes de TIL586, este péptido puede ser idéntico o similar al péptido natural procesado en las células tumorales y en los melanocitos. Esto se apoyaba además en los experimentos de inhibición del objetivo frío ya que este péptido fue capaz de competir por el reconocimiento de los linfocitos T con un péptido natural o con células tumorales.

Se publicó que los péptidos del epítipo de los linfocitos T procedentes del desplazamiento del marco de lectura del gen mutado de *poliposis coli* de la adenomatosis (APC) en el cáncer de colon fueron reconocidos por los CTL generados en ratones BALB/c vacunados (Townsend, A. *et al.* 1994 *Nature* 371:662). Los resultados de la Fig. 3 indicaron que se necesitaba ATG en los nucleótidos 294 a 296 para la traducción del producto de 24 aminoácidos que, a su vez, dio lugar al péptido antigénico reconocido por TIL586. TIL586 reconoció todavía el péptido sintético mutado pulsado en los linfocitos B de 586EBV, pero no el gen mutado cuando se transfectó en las células COS-7 junto con el ADNc de HLA-A31, indicando que la pérdida de reconocimiento del gen mutado (ATG en ATC) por TIL586 procedía de la eliminación de la traducción del producto ORF3. Estos resultados más el análisis de la secuencia del ADN regularon la posibilidad de que el péptido antigénico reconocido por TIL586 procediera del producto del desplazamiento del marco de lectura de gp75. Es posible, por lo tanto, que múltiples péptidos o proteínas sean traducidos a menudo desde marcos de lectura abiertos solapantes de un único gen eucariótico, pero esto significa que detectar estos productos alternativos no ha estado disponible. La sensibilidad exquisita de los linfocitos T para detectar los péptidos naturales puede poner de manifiesto muchos otros ejemplos de este fenómeno.

El mecanismo por el cual el marco de lectura abierto solapante 3 (ORF3) es traducido *in vivo* no está actualmente claro. Aunque se han publicado ejemplos de los ARNm celulares que se inician en más de un codón AUG, y que, en algunos casos raros, se inician tanto en el codón AUG como en uno distinto de AUG, tal como CUG, para generar secuencias idénticas extendidas con terminal N, la utilización de marcos de lectura abiertos solapantes (es decir que traducen dos péptidos completamente diferentes) de un solo ARNm celular eucariótico no se han descrito nunca a nuestro entender. Se han descrito varios ejemplos de traducción de marcos de lectura solapantes de un solo ARNm, pero limitados exclusivamente a genes víricos. La detección de los productos de los marcos de lectura solapantes en genes víricos ha sido posible debido a la existencia de anticuerpos reactivos en el suero de huéspedes infectados por virus. En la presente invención se utilizó un análisis de linfocitos T para identificar el péptido del epítipo reconocido por los linfocitos T. Este planteamiento es muy diferente y más sensible que los análisis de inmunoprecipitación o de transferencia de Western convencionales. Aunque existen cinco codones ATG entre el auténtico codón de inicio y el codón de inicio de ORF3, la construcción pPCR110 que abarca la parte N-terminal de ORF1 (gp75), los ORF2 y ORF3 completos (nucleótidos 1 a 667) conservaban todavía la capacidad de estimular la liberación de citocina de TIL586. El nivel de estimulación, sin embargo, fue varias veces inferior que el estimulado por la fórmula 5' truncada (que le falta los primeros 246 nucleótidos) de gp75 (Fig. 1A y 1B), lo que sugiere que los codones ATG corriente arriba pueden tener parcialmente inhibida la expresión de ORF3. Varios factores han hecho posible detectar la expresión del producto ORF3 en este sistema. En primer lugar, los codones ATG corriente arriba que proceden del codón de inicio ATG de ORF3 no parecían estar en el contexto óptimo, que puede permitir utilizar el ATG corriente abajo como codones de inicio por el modelo de identificación averiado. En segundo lugar, la expresión relativamente elevada de los genes transfectados en las células COS-7 y la disponibilidad del ensayo con linfocitos T como medio sumamente sensible puede permitir la detección de muy bajas concentraciones de los productos traducidos.

De forma conveniente, el producto ORF3 fue detectado por los linfocitos T en las células tumorales así como en melanocitos normales (Figuras 6A a 6D), sugiriendo intensamente que la proteína del ORF3 no era un producto génico procedente de alteraciones genéticas en las células tumorales. En los estudios anteriores se demostró que TIL586 reconocía las líneas celulares del tumor múltiple (gp75⁺/A31⁺) probadas, lo que sugiere que TIL586 reconoce un antígeno tumoral compartido, no mutado (Wang R.F. *et al.*, *ibid*). Ya que el gen gp75 está sumamente expresado en melanomas basados en la transferencia de Northern y en análisis de PCR (Wang R.F. *et al.*, *ibid*) y su proteína gp 75 del

producto génico es la glucoproteína intracelular más abundante expresada en células del melanoma y en melanocitos (Tai, T., Eisinger, M., Ogata, S. y Lloyd, K. O, 1983, *Cancer Res.* 43:2773-2779; Thomson, T. N., Mattes, J. M., Roux, L., Old, L. J. y Lloyd, K. O. 1985, *J. Invest. Dermat.* 85, 169-174; Thomson, T. N., real, F. X., Mutakami, S., Cordon-cardo, C., Old, L.J. y Houghton, A. N. 1988, *J. Invest. Dermat.* 90, 459-466), no es sorprendente que los clones de los linfocitos T reconocieran el péptido ORF3P cuando se pulsan en linfocitos B de 586EBV (A31⁺), melanoma (gp75⁺/A31⁺) así como melanocitos A31⁺, pero no células de melanoma gp75/A31⁺ o linfocitos T2 pulsados en células distintas de A31 de ORF3P. Otra posibilidad para explicar la expresión del péptido en células tumorales y en melanocitos es que el ORF3 pueda ser traducido a partir de una(s) transcripción(es) de ARNm independiente (s) generada(s) mediante corte y empalme alternativo del ARNm del gp75 o de un activador diferente. En nuestra opinión, las transcripciones de ARNm generadas por corte y empalme alternativo son traducidas en proteínas isomorfas mediante la utilización de los mismos marcos de lectura abiertos. En nuestro caso, sin embargo, si se generaba una transcripción independiente y se utilizaba como plantilla para la traducción, pero se utilizaba un marco de lectura abierto completamente diferente en comparación con gp75 para traducir el producto ORF3. Se necesitan experimentos adicionales para aclarar los mecanismos de traducción de la proteína ORF3 *in vivo*. No obstante, estas posibilidades mencionadas anteriormente no son mutuamente exclusivas.

REIVINDICACIONES

1. Péptido del cáncer aislado que comprende una variante de un péptido del cáncer que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 6, en el que la variante presenta por lo menos 85% de identidad de secuencia con SEC ID n°: 6, y en el que la variante estimula los linfocitos T específicos para el antígeno del cáncer.
2. Péptido del cáncer aislado según la reivindicación 1, en el que la variante comprende la SEC ID n°: 6 con una alanina sustituida por una serina en la posición 2 de SEC ID n°: 6.
3. Péptido del cáncer aislado según la reivindicación 1, en el que la variante comprende la SEC ID n°: 9 con una alanina sustituida por una serina en la posición 2 de SEC ID n°: 9.
4. Péptido del cáncer aislado constituido por una secuencia de aminoácidos presentada en SEC ID n°: 9 con una isoleucina sustituida por una metionina en la posición 1 de SEC ID n°: 9 y en el que el péptido del cáncer aislado estimula los linfocitos T específicos para el antígeno del cáncer.
5. Ácido nucleico aislado constituido por una secuencia de nucleótidos que codifica (i) una variante del péptido del cáncer aislado, en el que la variante presenta por lo menos 85% de identidad de secuencia con SEC ID n°: 6, y en el que la variante estimula los linfocitos T específicos para el antígeno del cáncer o (ii) un péptido del cáncer aislado constituido por una secuencia de aminoácidos presentada en SEC ID n°: 9 con una isoleucina sustituida por una metionina en la posición 1 de SEC ID n°: 9 y en el que el péptido del cáncer aislado estimula los linfocitos T específicos para el antígeno del cáncer.
6. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 7, en el que Xaa de SEC ID n°: 7 es Ala.
7. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 8, en el que Xaa de SEC ID n°: 8 es Ala.
8. Ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico según las reivindicaciones 5 a 7.
9. Vector recombinante que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
10. Virus recombinante que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
11. Virus recombinante según la reivindicación 10, en el que el virus es seleccionado de entre el grupo constituido por retrovirus, baculovirus, virus de Ankara, virus de viruela aviar, adenovirus y virus de vacuna.
12. Virus recombinante según la reivindicación 10 u 11, en el que el péptido del antígeno del cáncer procede de melanocitos.
13. Virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el ácido nucleico codifica el péptido del antígeno del cáncer que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 7 en el que Xaa de SEC ID n°: 7 es Ala.
14. Virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el ácido nucleico codifica el péptido del antígeno del cáncer que comprende el amino ácido de SEC ID n°: 8, en el que Xaa de SEC ID n°: 8 es Ala.
15. Célula aislada transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante según la reivindicación 9 o un virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14.
16. Anticuerpo aislado, o parte de unión al antígeno del mismo, que se une a una variante de un péptido del cáncer constituido por SEC ID n°: 6, en el que la variante presenta por lo menos 85% de identidad de secuencia con SEC ID n°: 6.
17. Anticuerpo aislado o parte de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 16, que une un péptido del cáncer de SEC ID n°: 7.
18. Anticuerpo aislado o parte de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 16, que une un péptido del cáncer de SEC ID n°: 9.
19. Anticuerpo aislado o parte de unión al antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

20. Anticuerpo aislado o parte de unión al antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

21. Kit que comprende el anticuerpo aislado o la parte de unión al antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20.

22. Kit según la reivindicación 21, comprendiendo además dicho kit reactivos de inmunoensayo estándar.

23. Procedimiento de detección de un péptido del cáncer en una muestra biológica que comprende:

a. poner en contacto la muestra con un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 en condiciones que formen un complejo inmunitario, y

b. detectar la presencia del complejo inmunitario.

24. Inmunógeno que comprende un péptido del cáncer según las reivindicaciones 1 a 4, solo o en combinación con por lo menos una molécula inmunoestimulante.

25. Inmunógeno según la reivindicación 24, en el que la molécula inmunoestimulante es una molécula MHC.

26. Composición farmacéutica que comprende un péptido del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, un vector recombinante según la reivindicación 9, un virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, una célula aislada según la reivindicación 15 o un anticuerpo o una parte de unión al antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, un inmunógeno según la reivindicación 24 ó 25, o una combinación de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

27. Composición farmacéutica según la reivindicación 26, que comprende además una molécula inmunoestimulante seleccionada de entre el grupo constituido por una molécula MHC de clase I, una molécula MHC de clase II, B7.1, B7.2, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, CD72, IL-1 a IL-15, TNF α , IFN γ , RANTES, G-CSF, M-CSF, IFN α , CTAP III, ENA-78, GRO, I-309, PF-4, IP-10, LD-78, MGSA, MIP-1 α , MIP-1 β y combinaciones de las mismas.

28. Animal transgénico no humano que expresa un péptido del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

29. Utilización de un péptido del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, un vector recombinante según la reivindicación 9, un virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, una célula según la reivindicación 15, un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, solo o en combinación con una molécula inmunoestimulante, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la inhibición o prevención del cáncer en un mamífero.

30. Procedimiento de preparación de un péptido del cáncer recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:

a. transferir un vector según la reivindicación 9 en una célula huésped, y

b. cultivar la célula huésped en condiciones apropiadas para la expresión del péptido del cáncer, y

c. recoger el péptido del cáncer recombinante.

31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que el vector comprende una secuencia de nucleótido que codifica una molécula MHC de clase I o una parte funcional de la misma.

32. Procedimiento para detectar la presencia de cáncer o precáncer en un mamífero que comprende:

a. poner en contacto un ácido nucleico según las reivindicaciones 5 a 8 con una muestra biológica de prueba de ARNm del mamífero, permitiendo así la formación de un complejo entre el ácido nucleico y el ARNm,

b. comparar la cantidad del producto de transcripción de ORF3 de TRP-1 en la muestra de prueba con una cantidad del producto de transcripción de ORF3 de TRP-1 de una muestra biológica normal conocida, en el que una cantidad incrementada del producto de transcripción de ORF3 de TRP-1 de la muestra de prueba es un indicio de cáncer o precáncer.

33. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que el cáncer es un melanoma.

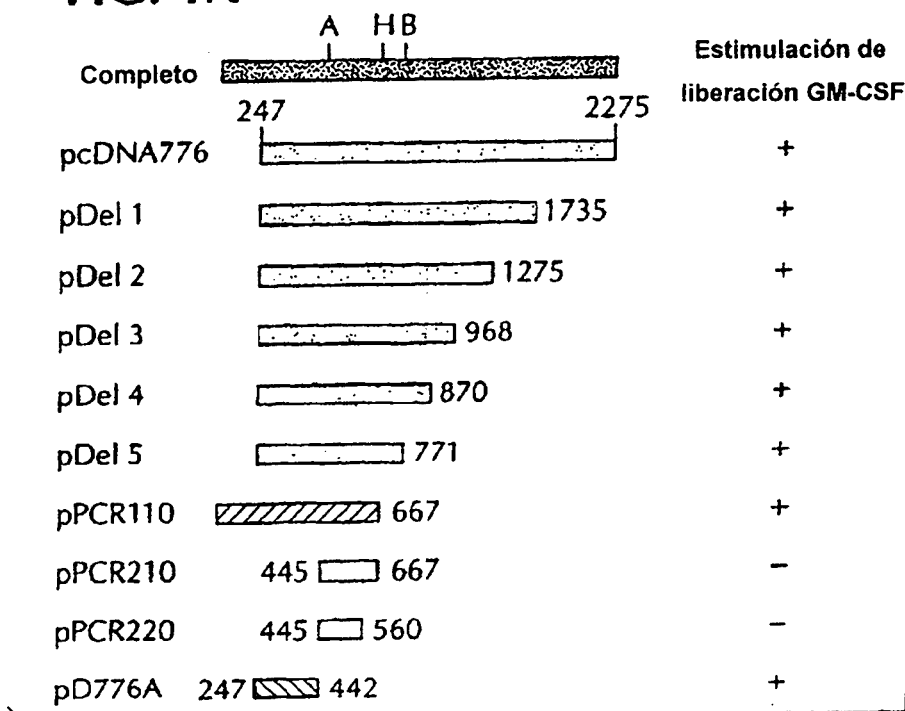
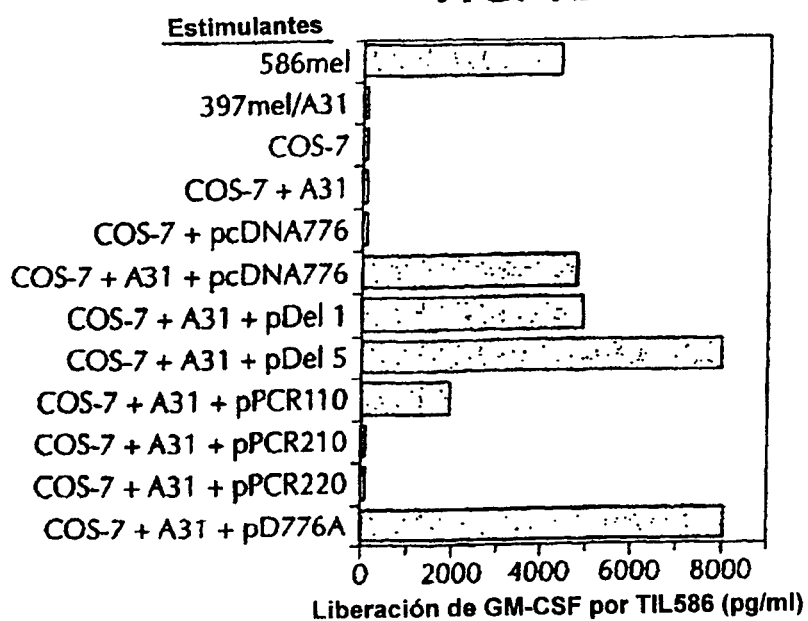
FIG. 1A**FIG. 1B**

FIG. 2

SEQ ID NO:1 → ATGAGTGTCTCCTAACTCCTCTCTCTGGGCTGTATCTTCTTCCCTTGCTACTTTTTCAG 60
 SEQ ID NO:2 → M S A P K L L S L G C I F F P L L L F Q
 ORF1 → CAGCCCCGGGCTCAATTCCCAAGACAGTGTGCCACTGTGAGGCTTTGAGAAGTGGTATG 120
 ORF1 → Q A R A Q F P R Q C A T V E A L R S G M
 ORF1 → TGTTGCCCAGACCTGTCCCCTGTGTCTGGCCTGGGACAGACCGCTGTGGCTCATCATCA 180
 ORF1 → C C P D L S P V S G P G T D R C G S S
 SEQ ID NO:3 → GGGAGGGGCAGATGTGAGGCAGTGCAGACTCCCGCCCCACAGCCCTCAGTATCCC 240
 ORF1 → G R G R C E A V T A D S R P H S P Q Y P SEQ ID NO:5
 ORF1 → CATGATGGCAGAGATGATCGGGAGGTCTGGCCCTTGGCTTCTTCAATAGGACATGTAC 300
 ORF1 → H D G R D D R E V W P L R F F N R T C H
 ORF2 → SEQ ID NO:4 → M I G R S G P C A S S I G H V T
 ORF3 → M S L SEQ ID NO:6
 ORF1 → TGCAACGGCAATTCTCAGGACACAACCTGTGGACGTGCCGCTCCTGGCTGGAGAGGAGCT 360
 ORF1 → C N G N F S G H N C G T C R P G W R G A
 ORF2 → A T A I S Q D T T V G R A V L A G E E L
 ORF3 → Q R Q F L R T Q L W D V P S W L E R S C
 ORF1 → GCCTGTGACCCAGAGGGTTCTCATAGTCAGGAGAAATCTTCTGGACTTAAGTAAAGAAGAA 420
 ORF1 → A C D Q R V L I V R R N L L D L S K E E
 ORF2 → P V T R G F S TERMINACIÓN
 ORF3 → L TERMINACIÓN
 ApaI
 ORF1 → AAGAACCACCTTTGTCCGGCCCTGGATATGGCAAGCGCACAACTCACCT...ATATGA 1584
 ORF1 → K N H F V R A L D M A K R T T H P

FIG. 3A

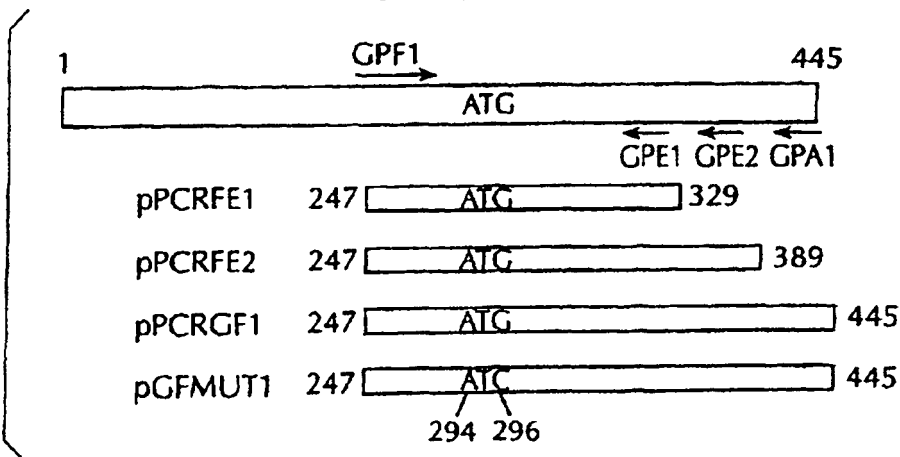


FIG. 3B

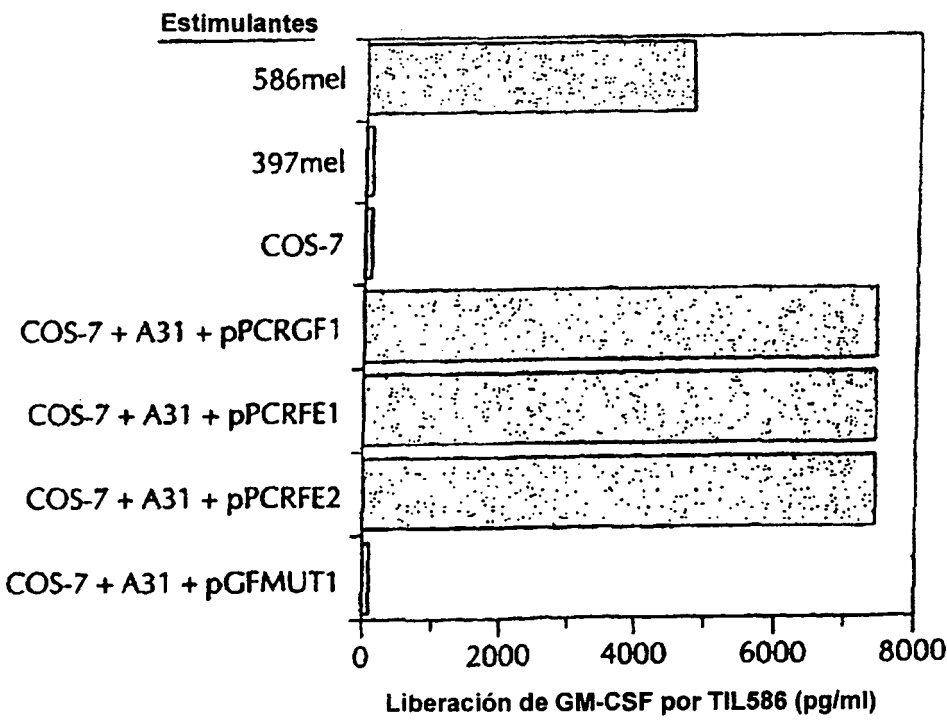


FIG. 4A

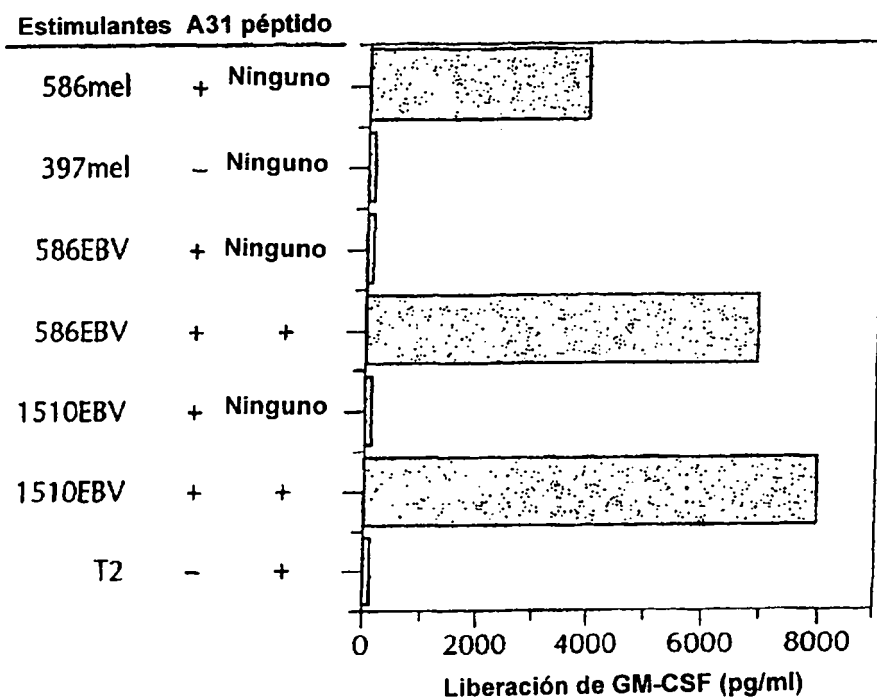


FIG. 8

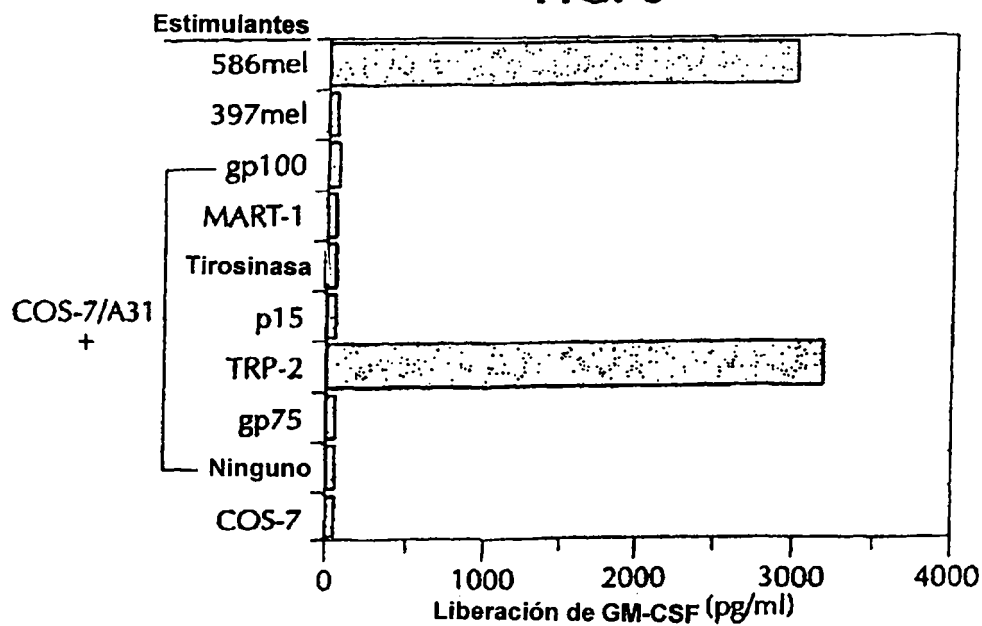


FIG. 4B

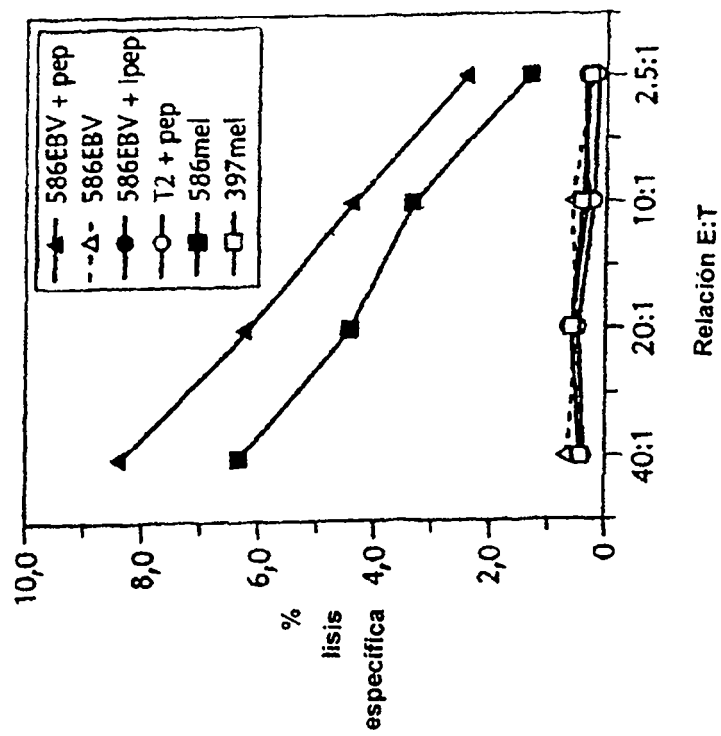


FIG. 4C

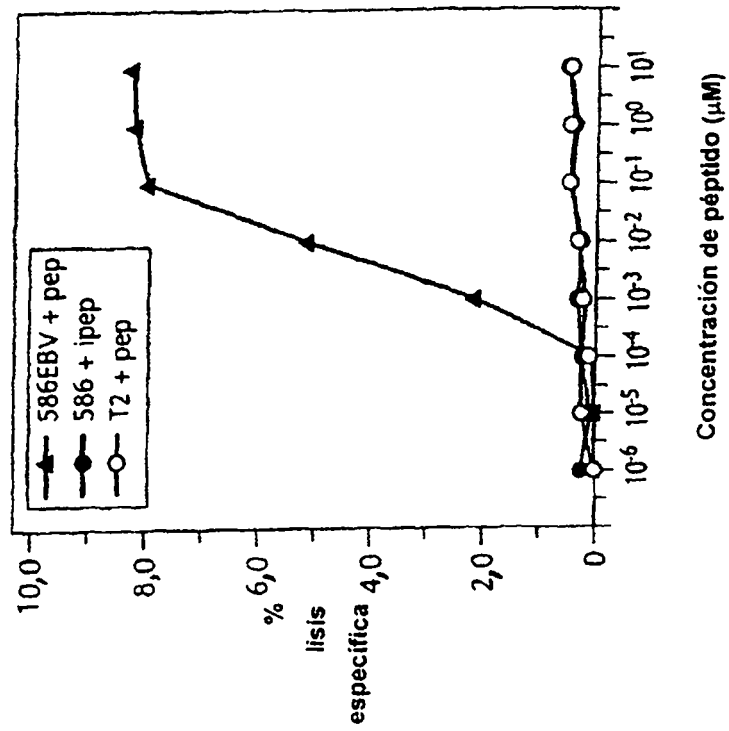


FIG. 5A

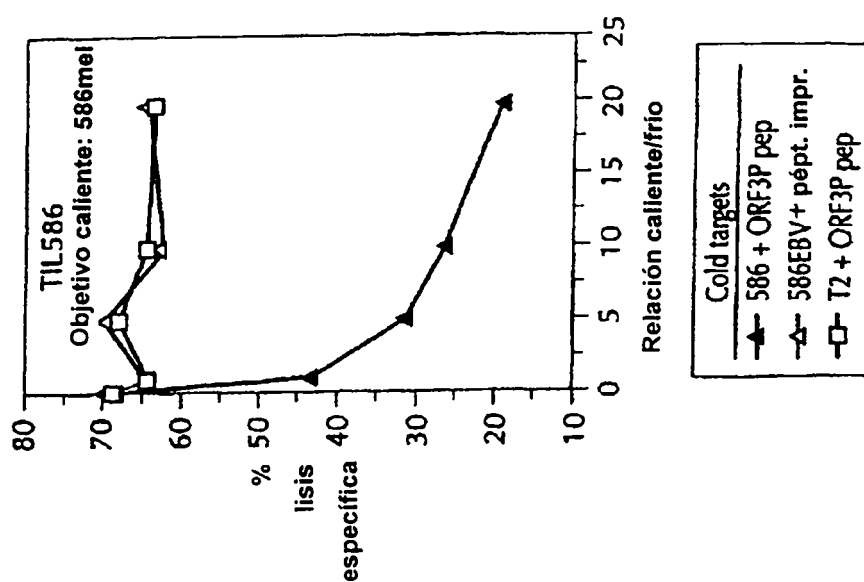


FIG. 5B

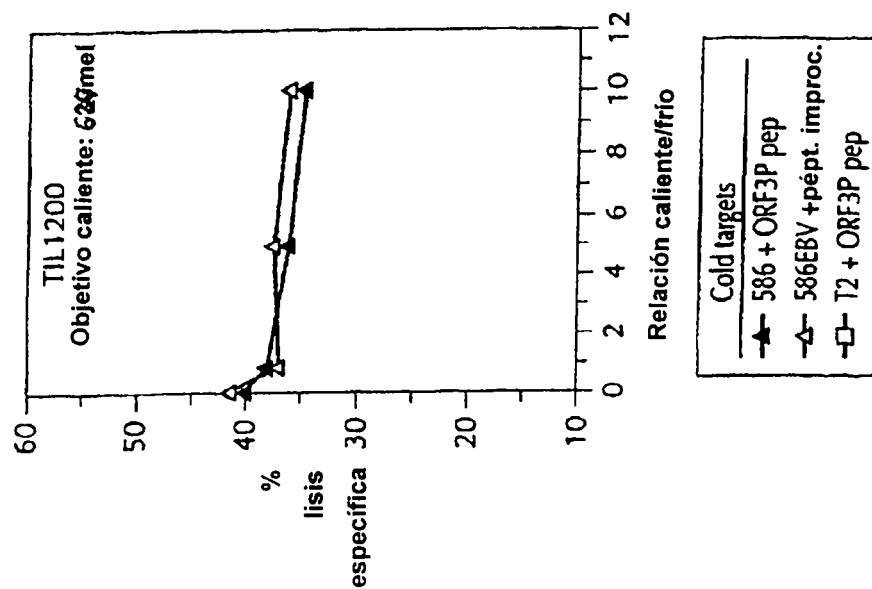


FIG. 6A

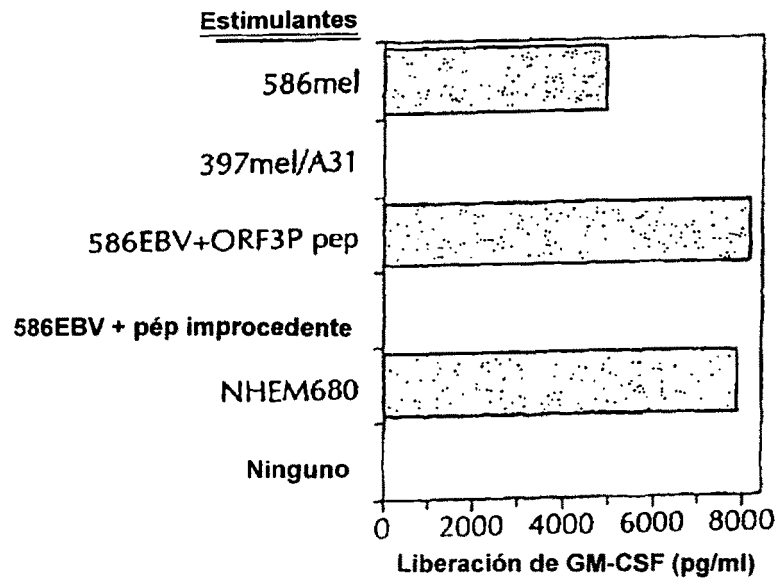


FIG. 6B

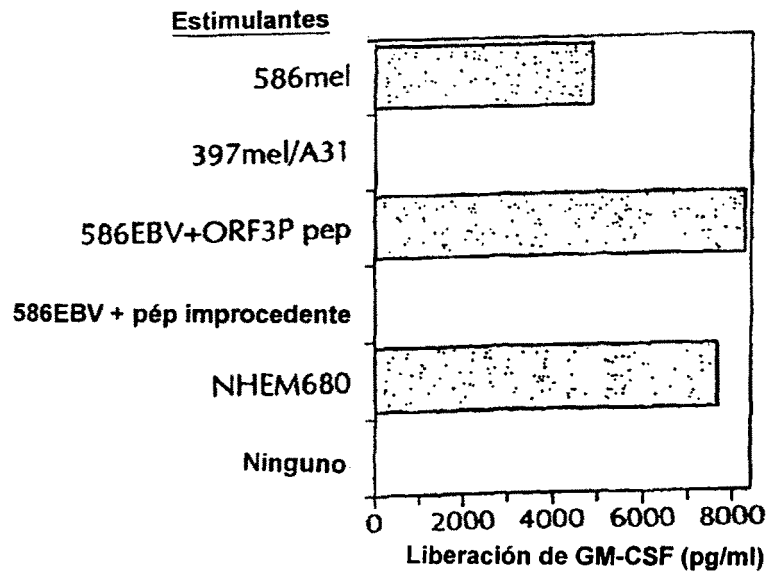


FIG. 6C

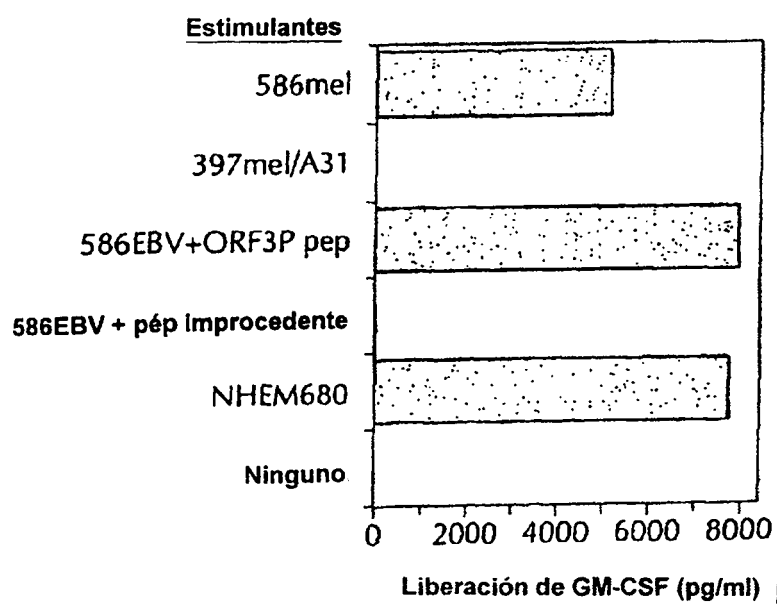


FIG. 6D

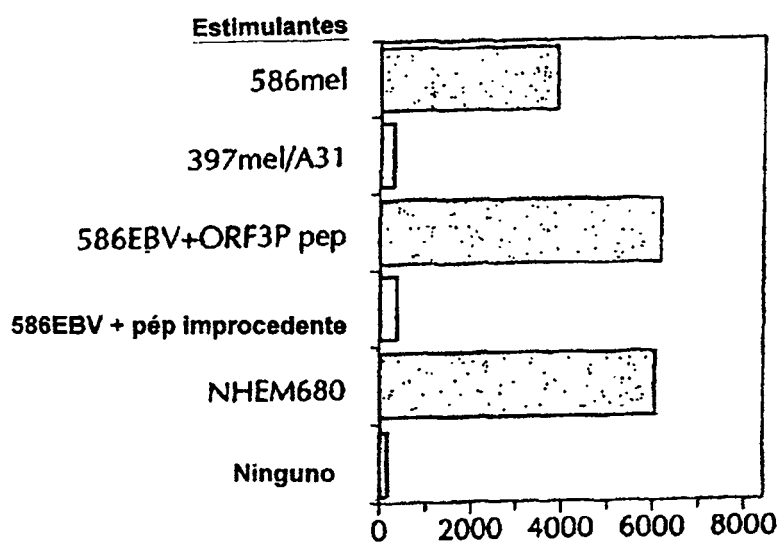


FIG. 7A

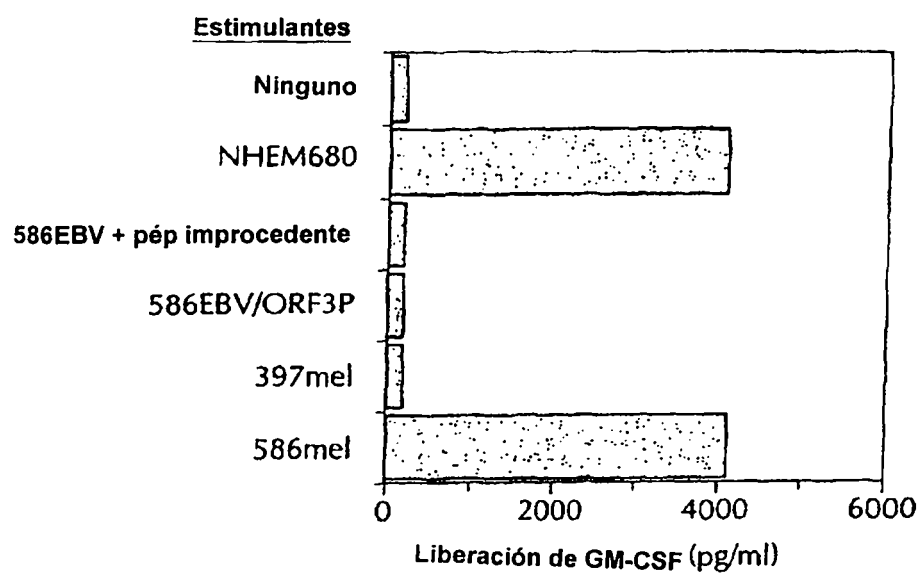


FIG. 7B

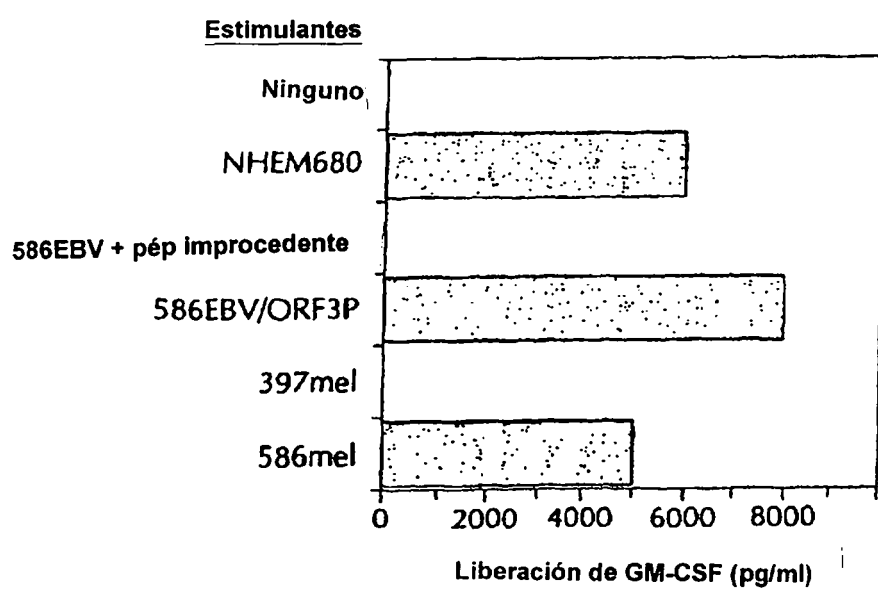


FIG. 11A

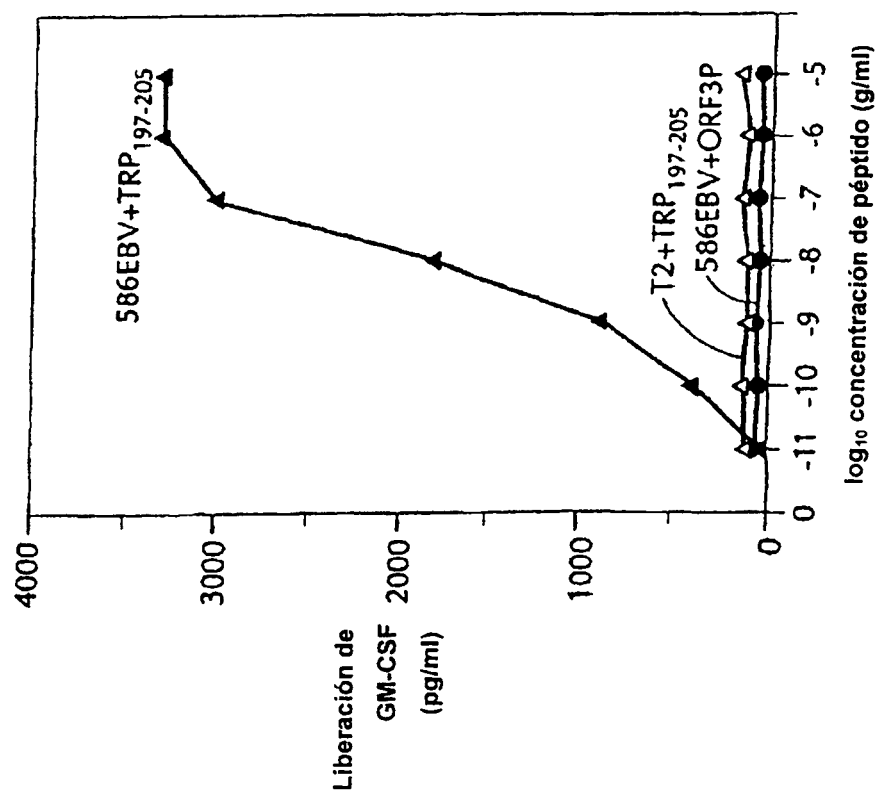


FIG. 11B

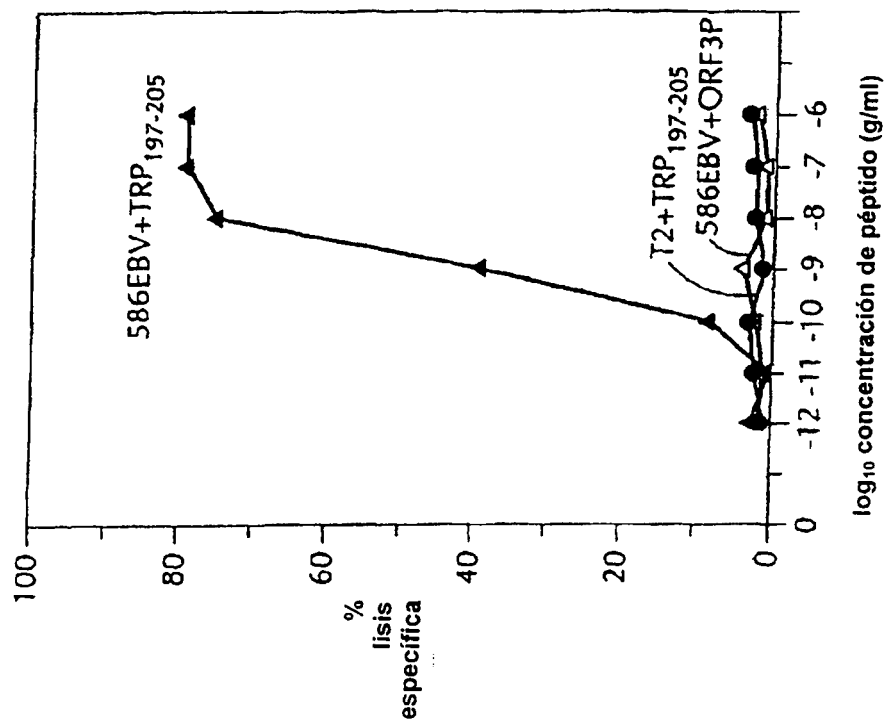
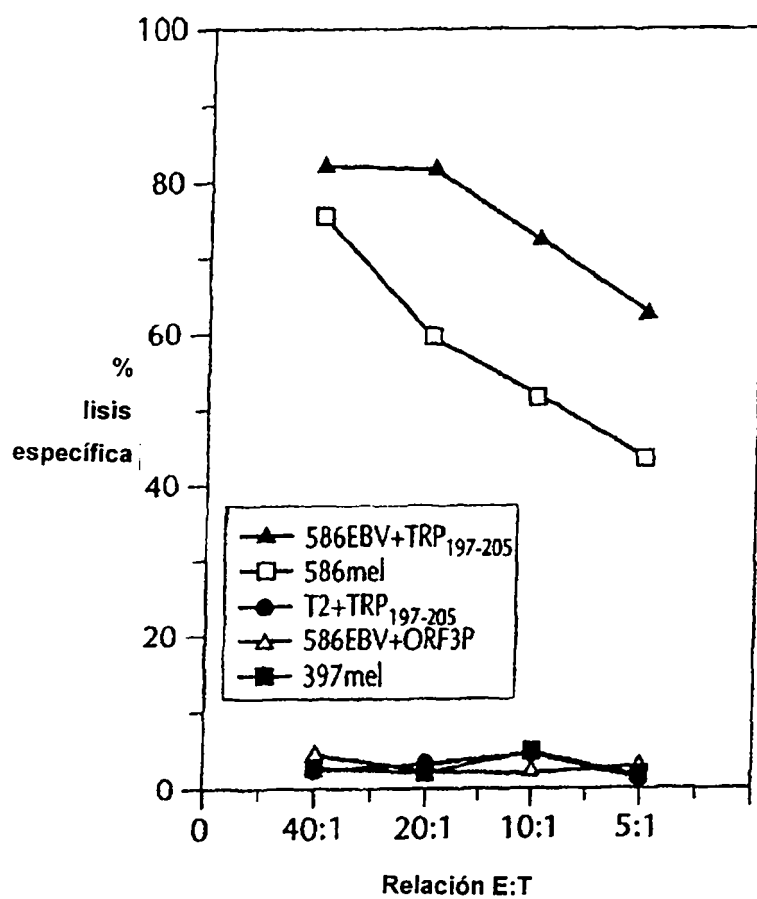


FIG. 11C



ES 2 305 379 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTES: EL GOBIERNO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA REPRESENTADO POR
EL SECRETARIO DE SANIDAD Y SERVICIOS HUMANOS
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTÍGENO DEL CÁNCER HUMANO DE LAS PROTEÍNAS 1 Y 2
RELACIONADAS CON LA TIROSINASA Y GEN CODIFICADOR DEL MISMO
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 60
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DIRECCIÓN: MORGAN & FINNEGAN, L.L.P.
- 15 (B) CALLE: 345 PARK AVENUE
- (C) CIUDAD: NEW YORK
- (D) ESTADO: NEW YORK
- 20 (E) PAÍS: USA
- (F) CP:10154
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: 3,5 PULGADAS, 1,44 MB DE ALMACENAMIENTO
- (B) ORDENADOR: IBM PC COMPATIBLE
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- 30 (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: WORDPERFECT 5.1
- (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:
- (A) FECHA DE PRESENTACIÓN: 06-FEB-1997
- 35 (vii) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/599.602
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 09-FEB-1996
- 40 (vii) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/725.736
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 04-OCT-1996
- 45 (viii) DATOS DE ABOGADO/AGENTE DE INFORMACIÓN:
- (A) NOMBRE: KATHRYN M. BROWN
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 34,556
- (C) REFERENCIA/NÚMERO DE DOCUMENTO: 2026-4209PC
- 50 (ix) INFORMACIÓN DE CONTACTO:
- (A) TELÉFONO: (212) 758-4800
- (B) FAX: (212) 751-6849
- 55 (C) TÉLEX: 421792

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID n°: 1:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 471 PARES DE BASES
- (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- (C) NÚMERO DE CADENAS: UNA
- 65 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: COHEN, T.; MULLER, R.M.; TOMITA, Y.; SHIBAHARA, S.

(B) TÍTULO: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL ADNc QUE CODIFICA LA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA TIROSINASA HUMANA

(C) REVISTA: NUCLEIC ACIDS RESEARCH

(D) VOLUMEN: 18

(E) EDICIÓN: 9

(F) PÁGINAS: 2807-2808

(G) FECHA: 11 MAYO 1990

(H) RESTOS APLICABLES EN LA SEC ID nº:1: DEL 1 AL 471

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1:

ATG AGT GCT CCT AAA CTC CTC TCT CTG GGC TGT ATC	36
Met Ser Ala Pro Lys Leu Leu Ser Leu Gly Cys Ile	
1 5 10	
TTC TTC CCC TTG CTA CTT TTT CAG CAG GCC CGG GCT	72
Phe Phe Pro Leu Leu Leu Phe Gln Gln Ala Arg Ala	
15 20	
CAA TTC CCA AGA CAG TGT GCC ACT GTT GAG GCT TTG	108
Gln Phe Pro Arg Gln Cys Ala Thr Val Glu Ala Leu	
25 30 35	
AGA AGT GGT ATG TGT TGC CCA GAC CTG TCC CCT GTG	144
Arg Ser Gly Met Cys Cys Pro Asp Leu Ser Pro Val	
40 45	
TCT GGG CCT GGG ACA GAC CGC TGT GGC TCA TCA TCA	180
Ser Gly Pro Gly Thr Asp Arg Cys Gly Ser Ser Ser	
50 55 60	
GGG AGG GGC AGA TGT GAG GCA GTG ACT GCA GAC TCC	216
Gly Arg Gly Arg Cys Glu Ala Val Thr Ala Asp Ser	
65 70	
CGG CCC CAC AGC CCT CAG TAT CCC CAT GAT GGC AGA	252
Arg Pro His Ser Pro Gln Tyr Pro His Asp Gly Arg	
75 80	
GAT GAT CGG GAG GTC TGG CCC TTG CGC TTC TTC AAT	288
Asp Asp Arg Glu Val Trp Pro Leu Arg Phe Phe Asn	
85 90 95	
AGG ACA TGT CAC TGC AAC GGC AAT TTC TCA GGA CAC	324
Arg Thr Cys His Cys Asn Gly Asn Phe Ser Gly His	
100 105	
AAC TGT GGG ACG TGC CGT CCT GGC TGG AGA GGA GCT	360
Asn Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arg Gly Ala	
110 115 120	
GCC TGT GAC CAG AGG GTT CTC ATA GTC AGG AGA AAT	396
Ala Cys Asp Gln Arg Val Leu Ile Val Arg Arg Asn	
125 130	
CTT CTG GAC TTA AGT AAA GAA GAA AAG AAC CAC TTT	432
Leu Leu Asp Leu Ser Lys Glu Glu Lys Asn His Phe	
135 140	
GTC CGG GCC CTG GAT ATG GCA AAG CGC ACA ACT CAC	468
Val Arg Ala Leu Asp Met Ala Lys Arg Thr Thr His	
145 150 155	
CCT	471
Pro	

ES 2 305 379 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 157 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 2:

```

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

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 129 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 3:

ES 2 305 379 T3

	ATG ATC GGG AGG TCT GGC CCT TGC GCT TCT TCA ATA	36
	Met Ile Gly Arg Ser Gly Pro Cys Ala Ser Ser Ile	
	1 5 10	
5	GGA CAT GTC ACT GCA ACG GCA ATT TCT CAG GAC ACA	72
	Gly His Val Thr Ala Thr Ala Ile Ser Gln Asp Thr	
	15 20	
10	ACT GTG GGA CGT GCC GTC CTG GCT GGA GAG GAG CTG	108
	Thr Val Gly Arg Ala Val Leu Ala Gly Glu Glu Leu	
	25 30 35	
15	CCT GTG ACC AGA GGG TTC TCA	129
	Pro Val Thr Arg Gly Phe Ser	
	40	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 43 AMINOÁCIDOS
 - (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 - (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 4:

30	Met Ile Gly Arg Ser Gly Pro Cys Ala Ser Ser Ile	
	1 5 10	
	Gly His Val Thr Ala Thr Ala Ile Ser Gln Asp Thr	
	15 20	
35	Thr Val Gly Arg Ala Val Leu Ala Gly Glu Glu Leu	
	25 30 35	
	Pro Val Thr Arg Gly Phe Ser	
	40	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 72 PARES DE BASES
 - (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 - (C) NÚMERO DE CADENAS: UNA
 - (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: SÍ
- (iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 5:

60	ATG TCA CTG CAA CGG CAA TTT CTC AGG ACA CAA CTG	36
	Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg Thr Gln Leu	
	1 5 10	
	TGG GAC GTG CCG TCC TGG CTG GAG AGG AGC TGC CTG	72
	Trp Asp Val Pro Ser Trp Leu Glu Arg Ser Cys Leu	
	15 20	

ES 2 305 379 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 AMINOÁCIDOS
- (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 6:

Met	Ser	Leu	Gln	Arg	Gln	Phe	Leu	Arg	Thr	Gln	Leu
1				5					10		
Trp	Asp	Val	Pro	Ser	Trp	Leu	Glu	Arg	Ser	Cys	Leu
		15					20				

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 AMINOÁCIDOS
- (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) DENOMINACIÓN/CLAVE: XAA
- (B) SITUACIÓN: 1 A 2
- (C) PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: EXPERIMENTAL
- (D) OTRA INFORMACIÓN: XAA = SER O ALA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 7:

Met	Xaa	Leu	Gln	Arg	Gln	Phe	Leu	Arg	Thr	Gln	Leu
1				5					10		
Trp	Asp	Val	Pro	Ser	Trp	Leu	Glu	Arg	Ser	Cys	Leu
		15					20				

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS
- (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) DENOMINACIÓN/CLAVE: XAA
- (B) SITUACIÓN: 1 A 2
- (C) PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: EXPERIMENTAL
- (D) OTRA INFORMACIÓN: XAA = SER O ALA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 8:

Met	Xaa	Leu	Gln	Arg	Gln	Phe	Leu	Arg
1				5				

ES 2 305 379 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 9:

Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg

1

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 10:

ATGTCACTGC AACGGCAATT TCTCAGG

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 66 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 11:

GCCATGGGCA GAGATGATCG GGAGGTCTGG CCCTTGCGCT
TCTTCAATAG GACATCTCAC TGCAAC

40
66

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

ES 2 305 379 T3

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 12:

GAAGATCTGC CATGGGCAGA GATGATCGGG AGGTCTG

37

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 13:

GAATTCGTTG TGTCTGAGA AATTGCCGTT G

31

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 14:

GAATTCGACT ATGAGAACCC TCTGGTCACA GGC

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 15:

AAGATCTGGG CCCGGACAAA GTGGTTCTTT TC

32

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 16:

GATATGG

7

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 17:

Asp Asp Arg Glu Val Trp Pro Leu Arg

1

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 18:

Val Trp Pro Leu Arg Phe Phe Asn Arg

1

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 305 379 T3

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 19:

10

Ser Gly His Asn Cys Gly Thr Cys Arg

1

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 20:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

20

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 20:

Cys Gly Thr Cys Arg Pro Gly Trp Arp

1

5

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 10 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 21:

45

Ala Cys Asp Gln Arg Val Leu Ile Val Arg

1

5

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 22:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

55

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 22:

60

Ala Cys Asp Gln Arg Val Leu Ile Val Arg Arg

1

5

10

65

ES 2 305 379 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 23:

Leu Trp Asp Val Pro Ser Trp Leu Glu Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 24

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 24:

Ala Ile Ser Gln Asp Thr Thr Val Gly Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 25:

Ala Ala Cys Asp Gln Arg Val Leu Ile Val Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 26

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 26:

Asp Gln Arg Val Leu Ile Val Arg Arg
1 5

ES 2 305 379 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 27

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 27:

Ile Val Arg Arg Asn Leu Leu Asp Leu Ser Lys

1

5

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 28:

Leu Ser Lys Glu Glu Lys Asn His Phe Val Arg

1

5

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 29:

GAGATGA

7

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 30:

GACATGT

7

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 31:

Ile Ser Gln Asp Thr Thr Val Gly Arg

1

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 32:

Ala Gly Glu Glu Leu Pro Val Thr Arg

1

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 33:

Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg Thr

1

5

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 34:

5 Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg Thr
 1 5

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

15 (B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 35:

 Met Ala Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg
 1 5

25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 36:

40 Met Leu Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg
 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 37:

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

50

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 37:

55

 Met Arg Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg
 1 5

60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

ES 2 305 379 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 38

5 Met Ser Leu Gln Arg Leu Phe Leu Arg
1 5

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

15 (B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 39:

25 Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Glu
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 40:

40 Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 41:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 AMINOÁCIDOS

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

50 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 41:

55 Ile Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg
1 5

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 42

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 32 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

ES 2 305 379 T3

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 42:

AGAATGAGTG CTCCTAAACT CCTCTCTCTG GG

32

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 43:

CATGTGAGAA AAGCTGGTCC CTCA

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 44:

TGGATATGGC AAAGCGCACA ACTC

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 PARES DE BASES

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: SÍ

ES 2 305 379 T3

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 45:

5 TAAATGGAAA TGTTCTCAAA TTGTGGCGTG 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 46:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 2291
 - (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 - 15 (C) NÚMERO DE CADENAS: DOS
 - (D) TOPOLOGÍA: DESCONOCIDA
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA
- 20 (A) DESCRIPCIÓN: ADNc
- (x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:
- (A) AUTORES: YOKAYAMA, ET AL.
 - 25 (B) TÍTULO: CLONACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE UN ADNc QUE CO-DIFICA PARA LA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA TIROSINASA 2/DOPACROMO TAUTOMERASA HUMANA
 - (C) REVISTA: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.
 - 30 (D) VOLUMEN: 1217
 - (E) EDICIÓN:
 - (F) PÁGINAS: 317-321
 - (G) FECHA: 1994
 - 35
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 46:

40 GCAATTAAAG TCAAGAGCTA AGGAGGGAGG GAGAGGGTTT 40

45

50

55

60

65

ES 2 305 379 T3

	AGAAATACCA GCATAATAAG TAGTATGACT GGGTGCTCTG	80
	TAAATTAACT CAATTAGACA AAGCCTGACT TAACGGGGGA	120
	AGATGGTGAG AAGCGCTACC CTCATTAAAT TTGGTTGTTA	160
5	GAGGCGCTTC TAAGGAAAT AAGTCTGTTA GTTGTTTGAA	200
	TCACATAAAA TTGTGTGTGC ACGTTCATGT ACACATGTGC	240
	ACACATGTAA CCTCTGTGAT TCTTGTGGGT ATTTTITTTAA	280
	GAAGAAAGGA ATAGAAAGCA AAGAAAAATA AAAAATACTG	320
	AAAAGAAAAG ACTGAAAGAG TAGAAGATAA GGAGAAAAGT	360
	ACGACAGAGA CAAGGAAAGT AAGAGAGAGA GAGAGCTCTC	400
10	CCAATTATAA AGCCATGAGC CCCCTTTGGT GGGGGTTTCT	440
	GCTCAGTTGC TTGGGCTGCA AAATCCTGCC AGGAGCCCAG	480
	GGTCAGTTCC CCCGAGTCTG CATGACGGTG GACAGCCTAG	520
	TGAACAAGGA GTGCTGCCCA CGCCTGGGTG CAGAGTCGGC	560
	CAATGTCTGT GGCTCTCAGC AAGGCCGGGG GCAGTGCACA	600
	GAGGTGCGAG CCGACACAAG GCCCTGGAGT GGTCCCTACA	640
15	TCCTACGAAA CCAGGATGAC CGTGAGCTGT GGCCAAGAAA	680
	ATTCTTCCAC CGGACCTGCA AGTGCACAGG AAATCTTGCC	720
	GGCTATAATT GTGGAGACTG CAAGTTTGGC TGGACCGGTC	760
	CCAACGTGCGA GCGGAAGAAA CCACCAGTGA TTCGGCAGAA	800
	CATCCATTCC TTGAGTCCTC AGGAAAGAGA GCAGTTCTTG	840
	GGCGCCTTAG ATCTCGCGAA GAAGAGAGTA CACCCCGACT	880
20	ACGTGATCAC CACACAACAC TGGCTGGGCC TGCTTGGGCC	920
	CAATGGAACC CAGCCGAGT TTGCCAACTG CAGTGTTTAT	960
	GATTTTTTTG TGTGGCTCCA TTATTATTCT GTTAGAGATA	1000
	CATTATTAGG ACCAGGACGC CCCTACAGGG CCATAGATTT	1040
	CTCACATCAA GGACCTGCAT TTGTTACCTG GCACCGGTAC	1080
25	CATTGTGTGT GTCTGGAAG AGATCTCCAG CGACTCATTG	1120
	GCAATGAGTC TTTTGTCTTG CCCTACTGGA ACTTTGCCAC	1160
	TGGGAGGAAC GAGTGTGATG TGTGTACAGA CCAGCTGTTT	1200
	GGGGCAGCGA GACCAGACGA TCCGACTCTG ATTAGTCGGA	1240
	ACTCAAGATT CTCCAGCTGG GAACTGTCT GTGATAGCTT	1280
	GGATGACTAC AACCACCTGG TCACCTTGTG CAATGGAACC	1320
	TATGAAGGTT TGCTGAGAAG AAATCAAATG GGAAGAAACA	1360
30	GCATGAAATT GCCAACCTTA AAAGACATAC GAGATTGCCT	1400
	GTCTCTCCAG AAGTTTGACA ATCTTCCCTT CTTCAGAAC	1440
	TCTACCTTCA GTTTCAGGAA TGCTTTGGAA GGGTTTGATA	1480
	AAGCAGATGG GACTCTGGAT TCTCAAGTGA TGAGCCTTCA	1520
	TAATTTGGTT CATTCTTCC TGAACGGGAC AAACGCTTTG	1560
35	CCACCTTCAG CCGCAATGA TCCCATTTTT GTGGTTCTTC	1600
	ATTCTTTTAC TGATGCCATC TTTGATGAGT GGATGAAAAG	1640
	ATTTAATCCT CCTGCAGATG CCTGGCCTCA GGAGCTGGCC	1680
	CCTATTGGTC ACAATCGGAT GTACAACATG GTTCCTTTCT	1720
	TCCCTECAGT GACTAATGAA GAACTCTTTT TAACCTCAGA	1760
	CCAACTTGGC TACAGCTATG CCATCGATCT GCCAGTTTCA	1800
40	GTTGAAGAAA CTCCAGGTTG GCCCACAAC CTCTTAGTAG	1840
	TCTTGGGAAC ACTGGTGGCT TTGGTTGGTC TTTTGTGCT	1880
	GTTGGCTTTT CTTCAATATA GAAGACTTCG AAAAGGATAT	1920
	ACACCCCTAA TGGAGACACA TTTAAGCAGC AAGAGATACA	1960
	CAGAAGAAGC CTAGGGTGCT CATGCCCTTAC CTAAGAGAAG	2000
	AGGCTGGCCA AGCCACAGTT CTGACGCTGA CAATAAAGGA	2040
45	ACTAATCCTC ACTGTTTCTT CTTGAGTTGA AGATCTTTGA	2080
	CATAGGTTCT TCTATAGTGA TGATGATCTC ATTCAGAAGA	2120
	TGCTTAGCTG TAGTTTCCGC TTTGCTTGCT TGTTTAACAA	2160
	ACCCAACTAA AGTGCTTGAG GCTACCTCTA CCTTCAAATA	2200
50		
	AAGATAGACC TGACAATTTG TGATATCTAA TAATAACCCC	2240
	CCCCCAATA TTGATTAAGC CTCCTCCTTT TCTGAAAGCA	2280
	TTTAAAAAA A	2291

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID n°: 47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 519

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: ADNc

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIÓN:

(A) AUTORES: YOKAYAMA, *ET AL.*(B) TÍTULO: CLONACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE UN ADN_c QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA TIROSINASA 2/DOPACROMO TAUTOMERASA HUMANA

(C) REVISTA: BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.

(D) VOLUMEN: 1217

(E) EDICIÓN:

(F) PÁGINAS: 317-321

(G) FECHA: 1994

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID n°: 47:

```

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

```

ES 2 305 379 T3

5 Leu Asp Leu Ala Lys Lys Arg Val His Pro Asp Tyr
 145 150 155
 Val Ile Thr Thr Gln His Trp Leu Gly Leu Leu Gly
 160 165
 Pro Asn Gly Thr Gln Pro Gln Phe Ala Asn Cys Ser
 170 175 180
 Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu His Tyr Tyr Ser
 185 190
 Val Arg Asp Thr Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr
 195 200
 10 Arg Ala Ile Asp Phe Ser His Gln Gly Pro Ala Phe
 205 210 215
 Val Thr Trp His Arg Tyr His Leu Leu Cys Leu Glu
 220 225
 Arg Asp Leu Gln Arg Leu Ile Gly Asn Glu Ser Phe
 230 235 240
 15 Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Phe Ala Thr Gly Arg Asn
 245 250
 Glu Cys Asp Val Cys Thr Asp Gln Leu Phe Gly Ala
 255 260
 Ala Arg Pro Asp Asp Pro Thr Leu Ile Ser Arg Asn
 265 270 275
 20 Ser Arg Phe Ser Ser Trp Glu Thr Val Cys Asp Ser
 280 285
 Leu Asp Asp Tyr Asn His Leu Val Thr Leu Cys Asn
 290 295 300
 Gly Thr Tyr Glu Gly Leu Leu Arg Arg Asn Gln Met
 305 310
 25 Gly Arg Asn Ser Met Lys Leu Pro Thr Leu Lys Asp
 315 320
 Ile Arg Asp Cys Leu Ser Leu Gln Lys Phe Asp Asn
 325 330 335
 Pro Pro Phe Phe Gln Asn Ser Thr Phe Ser Phe Arg
 340 345
 30 Asn Ala Leu Glu Gly Phe Asp Lys Ala Asp Gly Thr
 350 355 360
 Leu Asp Ser Gln Val Met Ser Leu His Asn Leu Val
 365 370
 35 His Ser Phe Leu Asn Gly Thr Asn Ala Leu Pro His
 375 380
 Ser Ala Ala Asn Asp Pro Ile Phe Val Val Leu His
 385 390 395
 Ser Phe Thr Asp Ala Ile Phe Asp Glu Trp Met Lys
 400 405
 40 Arg Phe Asn Pro Pro Ala Asp Ala Trp Pro Gln Glu
 410 415 420
 Leu Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Met Tyr Asn Met
 425 430
 Val Pro Phe Phe Pro Pro Val Thr Asn Glu Glu Leu
 435 440
 45 Phe Leu Thr Ser Asp Gln Leu Gly Tyr Ser Tyr Ala
 445 450 455
 Ile Asp Leu Pro Val Ser Val Glu Glu Thr Pro Gly
 460 465
 50 Trp Pro Thr Thr Leu Leu Val Val Met Gly Thr Leu
 470 475 480
 Val Ala Leu Val Gly Leu Phe Val Leu Leu Ala Phe
 485 490
 Leu Gln Tyr Arg Arg Leu Arg Lys Gly Tyr Thr Pro
 495 500
 55 Leu Met Glu Thr His Leu Ser Ser Lys Arg Tyr Thr
 505 510 515
 Glu Glu Ala

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID n°: 48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA: DESCONOCIDA

ES 2 305 379 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: PÉPTIDO TRP-2

(B) LOCALIZACIÓN: 1 a 11

(C) PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: POR EXPERIMENTO

(D) OTRA INFORMACIÓN: EN EL QUE Xaa PUEDE SER IGUAL O DIFERENTE Y PUEDE SER UNO O MÁS AMINOÁCIDOS

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID n°: 48:

Xaa Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg Xaa
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID n°: 49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID n°: 49:

Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID n°: 50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID n°: 50:

Thr Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID n°: 51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 51:

Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg Ala
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 52:

Leu Ile Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 53:

Leu Val Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 54:

Leu Ser Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5

ES 2 305 379 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9
- (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (C) NÚMERO DE CADENAS: UNA
- (D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

- (A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 55:

Leu Ala Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9
- (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (C) NÚMERO DE CADENAS: UNA
- (D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

- (A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 56:

Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9
- (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (C) NÚMERO DE CADENAS: UNA
- (D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

- (A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 57:

Lys Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 58:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9
- (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 58:

Leu Leu Gly Pro Gly Phe Pro Tyr Arg
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9

(B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) NÚMERO DE CADENAS: UNA

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: PÉPTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 59:

Leu Leu Gly Pro Gly Lys Pro Tyr Arg
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº: 60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27

(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

(C) NÚMERO DE CADENAS: DESCONOCIDO

(D) TOPOLOGÍA:DESCONOCIDA

(ii) TIPO DE MOLÉCULA

(A) DESCRIPCIÓN: OLIGONUCLEÓTIDO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 60:

TTATTAGGAC CAGGACGCCC CTACAGG

27