



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 574**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07751371 .1**

96 Fecha de presentación : **21.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1989224**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Péptidos inmunogénicos y métodos de uso.**

30 Prioridad: **24.02.2006 US 776506 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2011

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 60011 Executive Boulevard Suite 323 Rockville, Maryland 20852-3804, US**

72 Inventor/es: **Schlom, Jeffrey; Tsang, Kwong-Yok y Pastan, Ira, H.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 356 574 T3

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

Péptidos inmunogénicos y métodos de uso.

CAMPO

5 Esta solicitud se refiere al campo de agentes terapéuticos contra el cáncer, específicamente a péptidos inmunogénicos y su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, cervical, uterino y testicular.

ANTECEDENTES

10 El cáncer de próstata es el cáncer más habitualmente diagnosticado en los hombres y es la segunda causa más común de muerte por cáncer (Carter y Coffey, *Prostate* 16:39-48, 1990; Armbruster et al., *Clinical Chemistry* 39:181, 1993). Si se detecta en una fase temprana, el cáncer de próstata es potencialmente curable. Sin embargo, la mayoría de los casos se diagnostican en fase tardías cuando ya ha sucedido la metástasis del tumor primario (Wang et al., *Meth. Cancer Res.* 19:179, 1982). Incluso el diagnóstico temprano es problemático porque no todos los individuos que dan positivo en estas exploraciones desarrollan cáncer.

15 El tratamiento actual para el cáncer de próstata incluye prostatectomía radical, radioterapia, o terapia hormonal. Con intervención quirúrgica, no siempre se consigue la erradicación completa del tumor y la re-aparición observada del cáncer (12-68%) depende de la fase del tumor clínico inicial (Zietman et al., *Cancer* 71:959, 1993). Por tanto, son deseables métodos alternativos de tratamiento incluyendo profilaxis o prevención.

20 Los cánceres de próstata, testicular, y uterino, habitualmente se tratan, en parte, por la eliminación quirúrgica del órgano afectado. Hasta el 30% de los pacientes de los Estados Unidos con cáncer en fase temprana potencialmente curable, tal como cáncer de próstata, fallarán en cirugía convencional o radioterapia en 2004. Además, los pacientes con cáncer de próstata metastático disfrutan de un beneficio limitado de la quimioterapia convencional y las terapias basadas en hormonas. Las metástasis, sin embargo, pueden no ser susceptibles a eliminación quirúrgica, o pueden ser demasiado pequeñas para detectarse fácilmente. La potenciación de la respuesta inmune del paciente contra el cáncer; y particularmente la potenciación de la respuesta de linfocitos T citotóxicos ("CTL") contra el cáncer, pueden ayudar en la ralentización o detención del progreso de la enfermedad.

25 La inmunoterapia puede tener gran potencial para mejorar estos resultados, combinado la especificidad de tumor de la inmunidad mediada por células con la libertad de las quimioterapias tóxicas.

30 La inmunoterapia implica provocar una respuesta inmune contra las células cancerosas en base a su producción de antígeno diana. La inmunoterapia basada en respuestas inmunes mediadas por células implica generar una respuesta inmune mediada por células contra células que producen determinantes antigénicos particulares, mientras que la inmunoterapia basada en respuestas inmunes humorales implica generar anticuerpos específicos contra células que producen determinantes antigénicos particulares.

35 Estudios recientes muestran que la inmunoterapia de pacientes con cáncer puede mejorarse drásticamente por el hallazgo de que las CTL CD8+ reconocen y eliminan las células tumorales que presentan péptidos de antígenos asociados con tumores dentro de las moléculas MHC de clase I. En estudios clínicos se ha descubierto que las células T CD8+ efectoras desempeñan una tarea principal en la regresión tumoral. Se han identificado varios antígenos tumorales en modelos de cáncer de próstata y se han identificado los péptidos específicos de alelo HLA a partir de esos antígenos asociados con cáncer de próstata como epítomos de células T CD8+. Por ejemplo, se describieron péptidos de unión a HLA-A2.1 que se obtuvieron del antígeno específico de próstata (PSA) (Correale et al., *J Immunol* 161:3186, 1998), el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) (Tjoa et al., *Prostate* 28:65, 1996), el antígeno de células madre prostáticas (PSCA) (Kiessling et al., *Int J Cancer* 102:390, 2002), y la fosfatasa ácida de próstata (Peshwa et al., *Prostate* 36:129, 1998). Para PSA, están en progreso ensayos clínicos que usan diferentes estrategias de vacuna. Sin embargo, hay claramente una necesidad de identificar antígenos adicionales para ayudar en el diagnóstico de un cáncer de un órgano reproductor, y para su uso como agentes terapéuticos adicionales.

45 El documento WO 00/12706 describe PAGE-4 y usos

SUMARIO

La invención se define en las reivindicaciones.

50 El gen PAGE4 se expresa en tejidos reproductores, y se expresa en cánceres reproductores, tales como cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer testicular. En este documento se describen polipéptidos PAGE4 inmunogénicos. Estos polipéptidos pueden usarse en ensayos de diagnóstico para la expresión de PAGE4, así como para inducir una respuesta inmune contra PAGE4. En este documento se proporcionan polinucleótidos que codifican los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos, vectores que incluyen estos polipéptidos, células hospedadoras transformadas con estos vectores, y métodos para usar estos polipéptidos, polinucleótidos, vectores, y células hospedadoras.

55 Se describen polipéptidos PAGE4 inmunogénicos, tales como un polipéptido aislado que incluye como mucho diez aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos expuesta como

MSARVRSRSRGRGDGX₁X₂APDVVAFVAPGESQQEEPPTDNQDIEPGQEREGTPPIEERKX₃X₄GDCQEMDX₅EKTR
SERGDGSDVKEX₆X₇PPNPKHX₈KTKEAGDGQP (SEC ID N° 1, PAGE4 CONSENSO QUE MUESTRA
SUSTITUCIONES)

60 donde X₁ es Q o Y, X₂ es E o L, X₃ es V o Y, X₄ es E o L, X₅ es V o L, X₆ es K o Y, X₇ es T o L, y X₈ es A o

V. El polipéptido incluye uno de (a) los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1, (b) los aminoácidos 59 a 68 de la SEC ID N° 1, o (c) los aminoácidos 84 a 92 de la SEC ID N° 1.

5 Se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos, así como vectores de expresión que incluyen estos ácidos nucleicos. Estos vectores incluyen
 10 vectores virales, tales como, aunque sin limitación, vectores poxvirales. También se proporcionan células hospedadoras transformadas con estos vectores. En una realización, se describe una composición que incluye un primer virus recombinante que ha incorporado en un genoma viral o parte infectable del mismo un ácido nucleico que codifica el polipéptido PAGE4 inmunogénico y un segundo virus recombinante que ha incorporado en un genoma viral o parte infectable del mismo uno o más genes o secuencias de ADN que codifican B7-1, B7-2, o B7-1 y B7-2, donde la composición es capaz de co-infectar una célula hospedadora provocando la co-expresión del polipéptido y los genes o secuencias de ADN que codifican B7-1, B7-2, o B7-1 y B7-2.

También se proporcionan métodos para diagnóstica un cáncer de expresión de PAGE4, tal como un cáncer reproductor, que incluyen el uso de los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos descritos o los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos. Los cánceres ejemplares incluyen cáncer de próstata, uterino, o testicular.

15 También se describen métodos para inducir una respuesta inmune contra PAGE4. Los métodos incluyen el uso de los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos descritos en este documento, los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos, y/o vectores virales que codifican un polipéptido PAGE4 inmunogénico, solo o junto con otros agentes, tales como B7-1, B7-2, y/o una citoquina y/o con terapias tradicionales contra el cáncer, tales como cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. También se describen métodos para tratar a un sujeto con un tumor, tal como
 20 cánceres reproductores, por ejemplo, cáncer de próstata, uterino, o testicular.

Las características y ventajas anteriores y otras llegarán a ser más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Las FIG. 1A y 1B son gráficos lineales que muestran la unión de péptidos PAGE4 nativos y sus péptidos agonistas a moléculas HLA-A2. Los péptidos se analizaron para la unión a la línea celular T2 como se describe en el Ejemplo 1. Para los resultados presentados en la FIG. 1A, los péptidos se usaron a concentraciones de 0 a 25 µg/ml. Péptido P16 (○), P16-1 (●), P16-2 (▲), P84 (□) y P84-1 (■), control positivo (péptido MUC-1) (+) y control negativo (péptido de unión a HLA-A3) (X). Los resultados se expresan en intensidad de fluorescencia media (MFF). La FIG. 1B presenta una comparación de la estabilidad de los complejos peptídicos HLA-A2 de péptidos PAGE4 nativos y
 30 agonistas. Se incubaron células T2 durante una noche con péptido P16 (○), P16-1 (●), P16-2 (▲), P84 (□) y P84-1 (■) a una concentración de 12,5 µg/ml y después se lavaron para liberarlas de péptido no unido y se incubaron con brefeldina A para bloquear el suministro de nuevas moléculas de clase 1 en la superficie celular. En los momentos indicados, las células se tiñeron para la presencia de complejos superficiales péptido-HLA-A2. Los resultados se expresan en porcentaje relativo de unión en comparación con el 100% a tiempo 0.

35 La FIG. 2 es una serie de gráficos de barras que ilustran la capacidad de células B autólogas pulsadas con péptidos P16 nativos y agonistas de inducir la producción de IFN-γ, linfotactina, granzima B, TNF-α e IL-2 por la línea de células T derivada del péptido nativo (T-A-P16). Se usaron células T-A-P16 como efectores en una estimulación *in vitro* (IVS-4). Las células T se estimularon con células B autólogas irradiadas pulsadas con diferentes análogos de PAGE4 a una concentración de 12,5 µl/ml, y una proporción efector-a-APC de 1:3. Se recogieron sobrenadantes de cultivo de veinticuatro horas y se exploraron para la secreción de IFN-γ, Linfotactina, Granzima B, TNF-α e IL-2 usando ensayo ELISA.
 40

Las FIG. 3A-3D son gráficos de experimentos de activación de células T analizados por citometría de flujo que muestran que el péptido agonista P16-1 es más eficaz para activar las células T para lisar dianas pulsadas con péptido que el péptido P16 nativo así como para generar líneas de células T. La expresión de CD107a sobre la superficie celular de células T CD8+ y la correlación con la actividad citotóxica por la línea de células T específicas de PAGE4 (T-B-P16-1) contra células T2 pulsadas con P16-1 o P16. Se incubaron 0,5X10⁶ células efectoras/ml (FIG. 3a) solas, (FIG. 3b) con células T2 sin péptido, (FIG. 3c) con células T2 pulsadas con 12,5 µg/ml de péptido P16, o (FIG. 3d) con células T2 pulsadas con 12,5 µg/ml de péptido P16-1. Los resultados se expresan en % de células CD107a positivas y CD8 positivas. Los números de la parte superior derecha son % de lisis específica ± SD.
 45

50 La FIG. 4 es un gráfico de barras que muestra la citotoxicidad de una línea de células T específica para PAGE4 (T-A-P16, T-A-P16-1) contra células tumorales que expresan PAGE4 nativo y HLA-A2. La citotoxicidad de T-A-P16 (barra vacía) y T-A-P16-1 (barra rellena) contra células LNCaP con expresión endógena de PAGE4. Se realizó un ensayo de liberación de ¹¹¹In de 16 horas. Los resultados se expresan en porcentaje de lisis específica a una proporción efector-a-diana de 30:1 y 15:1. Barras = SD. Estadísticamente significativo (P<0,05, ensayo *t* bilateral). Los resultados demostraron que T-A-P16-1 tiene eficacia aumentada.
 55

Las FIG. 5A-5B son gráficos de barras que muestran la citotoxicidad de una línea de células T específica de PAGE4 (T-A-P16-1) contra células diana con expresión endógena de PAGE4 e inhibición de la lisis por inhibición de diana fría o anticuerpo anti-HLA-A2. Para los resultados presentados en la FIG. 5A, se usaron células LNCaP marcadas con ¹¹¹In y células T2 no marcadas a una proporción de 1:10. Las células T2 se incubaron con o sin péptido P16-1 (12,5 µg/ml) en medio libre de suero durante 2 horas a 37°C antes de la adición de las células T-A-P16-1. Para los resultados presentados en la FIG. 5B, se añadieron anticuerpo anti-HLA-A2 (10 µg/ml y 50 µg/ml) o 10 µg/ml de anticuerpo IgG de control a células LNCaP marcadas con ¹¹¹In durante 1 hora a 37°C antes de la adición de las células T-A-P16-1. Los resultados se expresan en porcentaje de lisis específica a una proporción efector-a-diana de 15:1. Barras = SD. Estadísticamente significativo (P<0,05, ensayo *t* bilateral).
 60

65 Las FIG. 6A-6B son una serie de gráficos que muestran la identificación de células T CD8+ específicas de

5 PAGE4-P16-1 en pacientes con cáncer de próstata. Se usó tetrámero PAGE4-P16-1/HLA-A*0201 marcado con PE o tetrámero de control gag de VIH/HLA-A*0201 marcado con PE. Se tiñeron 5×10^5 células T con $10 \mu\text{l}$ de tetrámeros y anticuerpo anti-CD8 durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Para los resultados presentados en la FIG. 6A, después de una estimulación *in vitro* (IVS) con DC autólogas pulsadas con péptido P16-1, se ensayaron PBMC de pacientes con cáncer de próstata (pacientes n° 1-n° 3) o PBMC de donantes sanos (donantes n° 1-n° 3) de forma simultánea. Se adquirieron 1×10^5 células en un citómetro de flujo FACSCALDBUR™ (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando el software CELL QUEST™ (BD Biosciences). Para los resultados presentados en la FIG. 6B, después de dos IVS con DC autólogas DC pulsadas con péptido P16-1, se ensayaron PBMC de pacientes con cáncer de próstata (pacientes n° 4 y n° 5) o PBMC de donantes sanos (donantes n° 4 y n° 5). Se adquirieron 1×10^5 células en un LSRII (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando el software FLOWJO™ (BD Biosciences). Los resultados se expresan en porcentaje de células tetrámero positivas y CD8 positivas.

LISTA DE SECUENCIAS

15 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos enumeradas en la lista de secuencias adjunta se muestran usando abreviaturas de una letra convencionales para las bases nucleotídicas, y el código de tres letras para los aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Se muestra solamente una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero la cadena complementaria se entiende incluida por cualquier referencia a la cadena presentada. En la lista de secuencias adjunta:

La SEC ID N° 1 es una secuencia de aminoácidos consenso para PAGE4

20 La SEC ID N° 2 es una secuencia de aminoácidos de PAGE4 de tipo silvestre ejemplar.

La SEC ID N° 3 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de PAGE4 de tipo silvestre.

Las SEC ID N° 4 y 5 son secuencias cebadoras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 I. Abreviaturas

APC: célula presentadora de antígeno

CTL: linfocito T citotóxico

DC: célula dendrítica

DMSO: dimetilsulfóxido

30 E/T: efector a diana

FACS: separación de células activadas por fluorescencia

FITC: isotiocianato de fluoresceína

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos

35 HLA: complejo principal de histocompatibilidad humano

ICAM: molécula de adhesión intracelular

IL: interleuquina

IFN: interferón

LFA: antígeno asociado a la función de leucocitos

40 MHC: complejo principal de histocompatibilidad

PBL: linfocitos de sangre periférica

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PE: ficoeritrina

RANTES: célula T normal expresada y secretada, regulada en la activación

45 TCR: receptor de células T

TNF: factor de necrosis tumoral

TIL: linfocitos de infiltración en tumor

µM: micromolar

II. Términos

Salvo que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de los términos habituales en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Para facilitar una revisión de las diversas realizaciones de esta descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Adyuvante: Un vehículo usado para potenciar la antigenicidad. Los adyuvantes incluyen una suspensión de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio, o fosfato) sobre la que se adsorbe el antígeno; o una emulsión de agua-en-aceite en la que se emulsiona la solución de antígeno en aceite mineral (adyuvante incompleto de Freund), a veces con la inclusión de micobacterias muertas (adyuvante completo de Freund) para potenciar adicionalmente la antigenicidad (inhibe la degradación del antígeno y/o causa la afluencia de macrófagos). También pueden usarse oligonucleótidos inmunoestimuladores (tales como aquellos que incluyen un motivo CpG) como adyuvantes (por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos Nº 6.194.388; la patente de Estados Unidos Nº 6.207.646; la patente de Estados Unidos Nº 6.214.806; la patente de Estados Unidos Nº 6.218.371; la patente de Estados Unidos Nº 6.239.116; la patente de Estados Unidos Nº 6.339.068; la patente de Estados Unidos Nº 6.406.705; y la patente de Estados Unidos Nº 6.429.199). Los adyuvantes incluyen moléculas biológicas (un "adyuvante biológico"), tales como moléculas co-estimuladoras. Los adyuvantes ejemplares incluyen IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L y 41 BBL.

Antígeno: Un compuesto, composición, o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluyendo aquellos inducidos por inmunógenos heterólogos. El término "antígeno" incluye todos los epítomos antigénicos relacionados. "Epítomo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno contra el que responden células B y/o T. En una realización, las células T responden contra el epítomo, cuando el epítomo se presenta junto con una molécula MHC. Los epítomos pueden formarse a partir tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen cuando se exponen a disolventes desnaturalizantes mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden cuando se tratan con disolventes desnaturalizantes. Un epítomo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente al menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

Un antígeno puede ser un antígeno específico de tejido, o un antígeno específico de enfermedad. Estos términos no son exclusivos, ya que un antígeno específico de tejido también puede ser un antígeno específico de enfermedad. Un antígeno específico de tejido se expresa en una cantidad limitada de tejidos, tal como un único tejido. Ejemplos no limitantes específicos de un antígeno específico de tejido son un antígeno específico de próstata, un antígeno específico de útero, y/o un antígeno específico de testículo. Un antígeno específico de tejido puede expresarse por más de un tejido, tal como, aunque sin limitación, un antígeno que se expresa en más de un tejido reproductor, tal como tanto en tejido de próstata como de útero. Un antígeno específico de enfermedad se expresa de forma coincidente con una patología. Ejemplos no limitantes específicos de un antígeno específico de enfermedad son un antígeno cuya expresión se correlaciona con, o es predictivo de, formación tumoral, tal como cáncer de próstata y/o cáncer uterino y/o cáncer testicular. Un antígeno específico de enfermedad puede ser un antígeno reconocido por células T o células B.

Amplificación: De una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o ARN) se refiere al uso de una técnica que aumenta la cantidad de copias de una molécula de ácido nucleico en una muestra. Un ejemplo de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa, en la que una muestra biológica recogida de un sujeto se pone en contacto con un par de cebadores oligonucleotídicos, en condiciones que permiten la hibridación de los cebadores con un molde de ácido nucleico en la muestra. Los cebadores se extienden en condiciones adecuadas, se disocian del molde, y después se vuelven a hibridar, extender, y disociar para amplificar la cantidad de copias del ácido nucleico. El producto de amplificación puede caracterizarse por electroforesis, patrones de escisión con endonucleasa de restricción, hibridación de oligonucleótidos o ligamiento, y/o secuenciación de ácido nucleico usando técnicas convencionales. Otros ejemplos de amplificación incluyen amplificación por desplazamiento de hebra, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.744.311; amplificación isotérmica sin transcripción, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 6.033.881; amplificación por reacción en cadena con reparación, como se describe en el documento WO 90/01069; amplificación por reacción en cadena con ligasa, como se describe en el documento EP-A-320 308; amplificación por reacción en cadena con ligasa con relleno de huecos, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.427.930; y amplificación sin transcripción de ARN NASBA™, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 6.025.134.

Anticuerpo: Moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno.

Un anticuerpo de origen natural (por ejemplo, IgG, IgM, IgD) incluye cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Sin embargo, se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo

de origen natural. Por tanto, se pretende que estos fragmentos de unión a antígeno también estén nombrados por el término "anticuerpo". Los ejemplos no limitantes específicos de fragmentos de unión abarcados dentro del término anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab que consta de los dominios V_L , V_H , C_L y C_H ; (ii) un fragmento F_d que consta de los dominios V_H y C_{H1} ; (iii) un fragmento F_v que consta de los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (iv) un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989) que consta de un dominio V_H ; (v) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; y (vi) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra.

5
10 Se conocen las inmunoglobulinas y ciertas variantes de las mismas y muchas se ha preparado en cultivo de células recombinantes (por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos Nº 4.745.055; la patente de Estados Unidos Nº 4.444.487; el documento WO 88/03565; el documento EP 256.654; el documento EP 120.694; el documento EP 125,023; Faoukner et al., *Nature* 298:286, 1982; Morrison, *J. Immunol.* 123:793, 1979; Morrison et al., *Ann Rev. Immunol* 2:239, 1984).

15 Animal: Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye tanto seres humanos como mamíferos no humanos. Asimismo, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios.

20 Cáncer o Tumor: Un neoplasma maligno que ha experimentado anaplasia característica con pérdida de diferenciación, aumento de la velocidad de crecimiento, invasión del tejido adyacente, y tiene capacidad de metástasis. Un cáncer reproductor es un cáncer que tiene su origen primario en un tejido reproductor, tal como en el útero, los testículos, el ovario, la próstata, las trompas de Falopio, o el pene. Por ejemplo, el cáncer de próstata es un neoplasma maligno que surge en o del tejido de la próstata, y el cáncer uterino es un neoplasma maligno que surge en o del tejido uterino, y el cáncer testicular es un neoplasma maligno que surge en los testículos. El cáncer residual es cáncer que permanece en un sujeto después de cualquier forma de tratamiento dado al sujeto para reducir o erradicar cáncer de tiroides. El cáncer metastático es un cáncer en uno o más sitios en el cuerpo diferentes del sitio de origen del cáncer original (primario) del que deriva el cáncer metastático. El cáncer de próstata es un tumor maligno, generalmente de origen glandular, de la próstata. Los cánceres de próstata incluyen adenocarcinomas y carcinomas microcíticos. Muchos cánceres de próstata expresan antígeno específico de próstata (PSA).

25
30 ADNc (ADN complementario): Un trozo de ADN que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc se sintetiza en el laboratorio por transcripción inversa a partir del ARN mensajero extraído de las células.

Variantes conservativas: Las sustituciones "conservativas" de aminoácidos son aquellas sustituciones que no afectan o disminuyen sustancialmente una actividad o la antigenicidad de un epítipo antigénico de PAGE4. Los ejemplos no limitantes específicos de una sustitución conservativa incluyen los siguientes ejemplos:

Resto Original	Sustituciones Conservativas
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

La expresión variación conservativa también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido precursor no sustituido, con la condición de que los anticuerpos creados contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido. Las sustituciones no conservativas son aquellas que reducen una actividad o la antigenicidad.

5 CD4: Grupo de factor de diferenciación 4, una proteína superficial de células T que media la interacción con la molécula MHC de clase II. CD4 también sirve como sitio principal de receptor para VIH en células T durante infección por VIH. Las células que expresan CD4 a menudo son células T auxiliares.

CD8: Grupo de factor de diferenciación 8, una proteína superficial de células T que media la interacción con la molécula MHC de clase I. Las células que expresan CD8 a menudo son células T citotóxicas.

10 Quimioterapia; agentes quimioterapéuticos: Como se usa en este documento, cualquier agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por crecimiento celular anormal. Dichas enfermedades incluyen tumores, neoplasmas y cáncer así como enfermedades caracterizadas por crecimiento hiperplásico tal como psoriasis. En una realización, un agente quimioterapéutico es un agente de uso para tratar neoplasmas tales como tumores sólidos. En una realización, un agente quimioterapéutico es una molécula radiactiva. Un especialista en la técnica puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico de uso (por ejemplo, véase Slapak y Kufe, *Principles of Cancer Therapy*, Capítulo 86 en Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición; Perry et al., *Chemotherapy*, Cap. 17 en Abeloff, *Clinical Oncology* 2ª ed., © 2000 Churchill Livingstone, Iric; Baltzer L, Berkery R (eds): *Oncology Pocket Guide to Chemotherapy*, 2ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (eds): *The Cancer Chemotherapy Handbook*, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993). Los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos descritos en este documento pueden usarse junto con agentes quimioterapéuticos adicionales.

25 Molécula co-estimuladora: Aunque el acoplamiento del TCR con péptido-MHC suministra una señal a la célula T, esta señal sola puede ser insuficiente para activar la célula T. Las moléculas co-estimuladoras son moléculas que, cuando se unen a su ligando, suministran una segunda señal necesaria para que la célula T llegue a activarse. La molécula co-estimuladora mejor conocida en la célula T es CD28, que se une a B7-1 (también llamada CD80) o B7-2 (también conocida como CD86). Una molécula co-estimuladora adicional es B7-3. Moléculas accesorias que también proporcionan una segunda señal para la activación de células T incluyen la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1 y ICAM-2), el antígeno asociado a la función de leucocitos (LFA-1, LFA-2 y LFA-3). Los miembros de la superfamilia de las integrinas y el factor de necrosis tumoral (TNF) también pueden servir como moléculas co-estimuladoras.

30 Variante degenerada: Un polinucleótido que codifica un epítipo de PAGE4 que incluye una secuencia que está degenerada como resultado del código genético. Existen 20 aminoácidos natural, la mayoría de los cuales están especificados por más de un codón. Por lo tanto, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas están incluidas en esta descripción siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido PAGE4 codificado por la secuencia de nucleótidos esté sin cambiar.

35 Célula dendrítica (DC): Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno (APC) principales implicadas en las respuestas inmunes primarias. Las células dendríticas incluyen células dendríticas plasmocitoides y células dendríticas mieloides. Su función principal es obtener antígeno en tejidos, migrar a órganos linfoides y presentar el antígeno para activar las células T. Las células dendríticas inmaduras se originan en la médula ósea y residen en la periferia como células inmaduras.

40 Diagnóstico: Identificar la presencia o naturaleza de una afección patológica tal como, aunque sin limitación, un cáncer reproductor, tal como cáncer de próstata, uterino o testicular. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo en el ensayo (porcentaje de verdaderos positivos). La "especificidad" de un ensayo de diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de falsos positivos se define como la proporción de aquellos sin enfermedad que dieron positivo en el ensayo. Aunque un método de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico. "Pronóstico" es la probabilidad de desarrollo (por ejemplo, gravedad) de una afección patológica, tal como cáncer de próstata, o metástasis.

50 Epítipo: Un determinante antigénico. Hay grupos químicos particulares o secuencias peptídicas en una molécula que son antigénicas (que provocan una respuesta inmune específica). Un anticuerpo se une específicamente a epítipo antigénico particular en un polipéptido. Los epítipos pueden formarse a partir tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen cuando se exponen a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden cuando se tratan con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, aproximadamente 9, u 8 a 10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, "Epitope Mapping Protocols" en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996). En una realización, un epítipo se une a una molécula MHC, tal como una molécula HLA o una molécula DR. Estas moléculas se unen a polipéptidos que tienen los aminoácidos de anclaje correctos separados por aproximadamente ocho a aproximadamente diez aminoácidos, tal como nueve aminoácidos.

65 Secuencias de control de la expresión: Las secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga a la que están unidas de forma funcional. Las secuencias de control de la expresión están unidas de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de la expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido

nucleico. Por tanto, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) delante del gen que codifica la proteína, la señal de corte y empalme para los intrones, el mantenimiento de la correcta fase de lectura de ese gen para permitir la traducción apropiada del ARNm, y codones de parada, apropiados. Se pretende que la expresión "secuencias de control" incluya, como mínimo, los componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañeros de fusión. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir un promotor.

Un promotor es una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. También se incluyen aquellos elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión del gen dependiente de promotor sea controlable de forma específica de tipo celular, específica de tejido, o inducible por señales o agentes externos; dichos elementos pueden estar localizados en las regiones 5' o 3' del gen. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducible (véase por ejemplo, Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987). Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL del bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares. En una realización, cuando se clona en sistemas celulares de mamífero, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamífero (tales como el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (tales como la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). También pueden usarse promotores producidos por ADN recombinante o técnicas sintéticas para proporcionar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico.

Heterólogo: Que se origina de fuentes o especies genéticamente diferentes. Un polipéptido que es heterólogo a PAGE4 se origina a partir de un ácido nucleico que no codifica PAGE4. En un ejemplo no limitante específico, un polipéptido que comprende nueve aminoácidos consecutivos de PAGE4 y una secuencia de aminoácidos heteróloga incluye una secuencia de aminoácidos de β -galactosidasa, una proteína de unión a maltosa, y albúmina, el antígeno superficial de hepatitis B, o una inmunoglobulina. Generalmente, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de interés no se unirá específicamente a una proteína heteróloga.

Células hospedadoras: Células en las que puede propagarse un vector y expresarse su ADN. La célula puede ser procariota o eucariota. La célula puede ser de mamífero, tal como una célula humana. El término también incluye cualquier descendencia de la célula hospedadora del sujeto. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica a la célula precursora ya que puede haber mutaciones que suceden durante la replicación. Sin embargo, dicha descendencia se incluye cuando se usa la expresión "célula hospedadora".

Respuesta inmune: Una respuesta de una célula del sistema inmune, tal como una célula B, célula T, o monocito, a un estímulo. En una realización, la respuesta es específica para un antígeno particular (una "respuesta específica de antígeno"). En una realización, una respuesta inmune es una respuesta de células T, tal como una respuesta CD4+ o una respuesta CD8+. En otra realización, la respuesta es una respuesta de células B, y provoca la producción de anticuerpos específicos.

Péptido inmunogénico: Un péptido que comprende un motivo específico de alelo u otra secuencia de modo que el péptido se una a una molécula MHC e induzca una respuesta de linfocitos T citotóxicos ("CTL"), o una respuesta de células B (por ejemplo, producción de anticuerpos) contra el antígeno del que se obtiene el péptido inmunogénico.

En una realización, los péptidos inmunogénicos se identifican usando motivos de secuencia u otros métodos, tales como redes neurales o determinaciones polinomiales, conocidos en la técnica. Típicamente, se usan algoritmos para determinar el "umbral de unión" de péptidos para seleccionar aquellos con valores que les dan una elevada probabilidad de unión a una cierta afinidad y serán inmunogénicos. Los algoritmos se basan en los efectos sobre la unión a MHC de un aminoácido particular en una posición particular, los efectos sobre la unión al anticuerpo de un aminoácido particular en una posición particular, o los efectos sobre la unión de una sustitución particular en un péptido que contiene un motivo. Dentro del contexto de un péptido inmunogénico, un "resto conservado" es uno que aparece en una frecuencia significativamente mayor que la que se esperaría por distribución aleatoria en una posición particular en un péptido. En una realización, un resto conservado es uno donde la estructura MHC puede proporcionar un punto de contacto con el péptido inmunogénico.

Los péptidos inmunogénicos también pueden identificarse midiendo su unión a una proteína MHC específica (por ejemplo, HLA-A02.01) y por su capacidad de estimular CD4 y/o CD8 cuando se presentan en el contexto de la proteína MHC.

Un "péptido PAGE-4" inmunogénico es una serie de restos aminoácidos contiguos de la proteína PAGE-4 generalmente entre 7 y 20 aminoácidos de longitud, tal como de aproximadamente 8 a 11 restos de longitud. Los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos se describen, por ejemplo, en la publicación PCT N° 00/12706. Se describen polipéptidos PAGE4 inmunogénicos específicos en este documento que son de 9 ó 10 restos aminoácidos de longitud. Generalmente, el polipéptido PAGE4 inmunogénico puede usarse para inducir una respuesta inmune en un sujeto, tal como una B respuesta de células B o una respuesta de células T. En un ejemplo, un polipéptido PAGE4 inmunogénico, cuando se une a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, activa los linfocitos T citotóxicos (CTL) contra células que expresan la proteína PAGE-4 de tipo silvestre. La inducción de CTL usando péptidos sintéticos y los ensayos de citotoxicidad de CTL son conocidos en la técnica, véase la patente de Estados Unidos 5.662.907, que se incorpora en este documento por referencia. En un ejemplo, un péptido inmunogénico incluye un motivo específico de alelo u otra secuencia de modo que el péptido se una a una molécula MHC e induzca una respuesta de linfocitos T citotóxicos ("CTL") contra el antígeno del que se obtiene el péptido inmunogénico.

Composición inmunogénica: Una composición que comprende un polipéptido PAGE4 inmunogénico o un ácido nucleico que codifica el polipéptido PAGE4 inmunogénico que induce una respuesta CTL medible contra células que expresan el polipéptido PAGE4, o induce una respuesta de células B medible (tal como la producción de

anticuerpos que se unen específicamente a PAGE4) contra un polipéptido PAGE4. Para uso *in vitro*, la composición inmunogénica puede constar del ácido nucleico aislado, un vector que incluye el ácido nucleico y/o el péptido inmunogénico. Para uso *in vivo*, la composición inmunogénica típicamente comprenderá el ácido nucleico, el vector que incluye el ácido nucleico, y/o el polipéptido inmunogénico, en vehículos farmacéuticamente aceptables, y/u otros agentes. Una composición inmunogénica puede incluir opcionalmente un adyuvante, una molécula co-estimuladora, o un ácido nucleico que codifica una molécula co-estimuladora. Un polipéptido PAGE4, o un ácido nucleico que codifica el polipéptido, puede ensayarse fácilmente para su capacidad de inducir CTL por ensayos reconocidos en la técnica.

Inhibición o tratamiento de una enfermedad: La inhibición de una enfermedad, tal como crecimiento tumoral, se refiere a la inhibición del desarrollo completo de una enfermedad. En varios ejemplos, la inhibición de una enfermedad se refiere a la reducción de los síntomas de un tumor, tal como la prevención del desarrollo del síndrome paraneoplásico en una persona que se sabe que tiene un cáncer reproductor, tal como cáncer de próstata, uterino o testicular, o reducir un signo o síntoma del tumor. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica relacionada con la enfermedad, tal como el tumor.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos de la célula del organismo en la que componente existe de forma natural, es decir, otro ADN cromosómico y extra-cromosómico y ARN, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados por métodos de purificación convencionales. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula hospedadora así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

Marcador: Un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente con otra molécula para facilitar la detección de esa molécula. Los ejemplos no limitantes específicos de marcadores incluyen marcas fluorescentes, enlaces enzimáticos, e isótopos radiactivos.

Secuencia enlazadora: Una secuencia enlazadora es una secuencia de aminoácidos que se une covalentemente a dos dominios polipeptídicos. Las secuencias enlazadoras pueden incluirse entre los epítomos PAGE4 descritos en este documento para proporcionar libertad rotacional a los dominios polipeptídicos unidos y de este modo para promover el pegamiento apropiado del dominio y la presentación al MHC. A modo de ejemplo, en un polipéptido recombinante que comprende dos dominios PAGE4, pueden proporcionarse secuencias enlazadoras entre ellos, tal como un polipéptido que comprende polipéptido PAGE4-enlazador-polipéptido PAGE4. Las secuencias enlazadoras, que generalmente son entre 2 y 25 aminoácidos de longitud, son bien conocidas en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, el espaciador glicina(4)-serina (GGGS x3) descrito por Chaudhary et al., *Nature* 339:394-397, 1989.

Linfocitos: Un tipo de glóbulo blanco que está implicado en las defensas inmunes del cuerpo. Hay dos tipos principales de linfocitos: células B y células T.

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC): Una denominación genérica que pretende abarcar los sistemas de histocompatibilidad descritos en diferentes especies, incluyendo los antígenos de leucocitos humanos ("HLA").

Mamífero: Este término incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. Asimismo, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios.

Neoplasma: Una proliferación celular anormal, que incluye tumores benignos y malignos, así como otros trastornos proliferativos.

Oligonucleótido: Una secuencia polinucleotídica lineal de hasta aproximadamente 100 bases nucleotídicas de longitud.

Fase de lectura abierta (ORF): Una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación interno. Estas secuencias habitualmente se traducen en un péptido.

Unido de forma funcional: Una primera secuencia de ácido nucleico está unida de forma funcional con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está colocada en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido de forma funcional a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante, tal como una secuencia que codifica un polipéptido PAGE4. Generalmente, las secuencias de ADN unidas de forma funcional son contiguas y, donde sea necesario para unir dos regiones codificantes de proteína, en la misma fase de lectura.

PAGE4: Un polipéptido expresado en próstata y otros tejidos. En particular, se expresa en cánceres de próstata, ovarios, y testículos. Una secuencia ejemplar de PAGE-4 se expone en la siguiente descripción detallada, y se describe en la publicación PCT N° WO 00/12706. Como se usa en este documento, una "proteína PAGE-4" se refiere a la proteína codificada por el gen PAGE-4. Con respecto a composiciones inmunogénicas que comprende una proteína PAGE-4, se refiere adicionalmente a variaciones de esta proteína en las que hay sustituciones conservativas de uno o más aminoácidos de la proteína, o deleciones o inserciones de uno o más aminoácidos, siempre que las variaciones no alteren en más del 20% la capacidad de la proteína, cuando se une a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, de activar linfocitos T citotóxicos contra células que expresan la PAGE-4 de tipo silvestre. PAGE4 de tipo silvestre (por ejemplo, SEC ID N° 1) se expresa por cáncer uterino, de próstata y testicular (véase Brinkman et al., *Cancer Res.* 59: 1445-1448, 1999; Brinkman et al., *PNAS USA* 95: 10757-19762, 1998).

Modificaciones de péptidos: Los epítomos PAGE4 incluyen realizaciones sintéticas de péptidos descritos en este documento. Además, pueden utilizarse análogos (moléculas orgánicas no peptídicas), derivados (moléculas

peptídicas químicamente funcionalizadas obtenidas partiendo con las secuencias peptídicas descritas) y variantes (homólogos) de estas proteínas en los métodos descritos en este documento. Cada polipéptido de esta descripción está compuesto por una secuencia de aminoácidos, que pueden ser L- y/o D-aminoácidos, de origen natural y diferente.

5 Los péptidos pueden modificarse por una diversidad de técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad que los péptidos no modificados, y opcionalmente que tienen otras propiedades deseables. Por ejemplo, pueden proporcionarse grupos ácido carboxílico de la proteína, ya sea en el extremo carboxilo o en la cadena lateral, en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificarse para formar un éster C₁-C₁₆, o convertirse en una amida de fórmula NR₁R₂ donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o alquilo C₁-C₁₆, o combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sea en el extremo amino o en la cadena lateral, pueden estar en forma de una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable, tal como las sales HCl, HBr, acética, benzoica, toluenosulfónica, maleica, tartárica y otras sales orgánicas, o pueden modificarse en alquil C₁-C₁₆ o dialquilamino o convertirse adicionalmente en una amida.

15 Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales del péptido pueden convertirse en alcoxi C₁-C₁₆ o en un éster C₁-C₁₆ usando técnicas bien reconocidas. Los anillos fenilo y fenólicos de las cadenas laterales del péptido puede sustituirse con uno o más átomos de halógeno, tales como flúor, cloro, bromo o yodo, o con alquilo C₁-C₁₆, alcoxi C₁-C₁₆, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de dichos ácidos carboxílicos. Los grupos metileno de las cadenas laterales del péptido pueden prolongarse en alquilenos C₂-C₄ homólogos. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera de varios grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos acetamida. Los especialistas en la técnica también reconocerán métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de esta invención para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que produzcan una estabilidad potenciada.

25 Se prevén realizaciones peptidomiméticas y organomiméticas, por las cuales la disposición tridimensional de los constituyentes químicos de dichos péptido- y organomiméticos imitan la disposición tridimensional de la estructura peptídica y las cadenas laterales de los aminoácidos componentes, produciendo dichos péptido- y organomiméticos de un polipéptido PAGE4 inmunogénico que tienen capacidad medible o potenciada de generar una respuesta inmune. Para aplicaciones de modelado informático, un farmacóforo es una definición tridimensional idealizada de los requisitos estructurales para la actividad biológica. Los péptido- y organomiméticos pueden diseñarse para ajustar cada farmacóforo con el software de modelado informático actual (usando diseño de fármacos asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs," en Klegerman y Groves, eds., 1993, *Pharmaceutical Biotechnology*, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pág. 165-174 y *Principles of Pharmacology*, Munson (ed.) 1995, Cap. 102, para descripciones de técnicas usadas en CADD. También se incluyen miméticos preparados usando dichas técnicas.

35 Vehículos farmacéuticamente aceptables: Los vehículos farmacéuticamente aceptables de uso son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975), describe composiciones y formulaciones para el suministro farmacéutico de las proteínas de fusión descritas en este documento.

40 En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se está empleando. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (tales como formas de polvo, píldora, comprimido, o cápsula), los vehículos sólidos no tóxico convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitán.

45 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de una composición o una célula para conseguir un efecto deseado en un sujeto que se está tratando. Por ejemplo, ésta puede ser la cantidad necesaria para inducir una respuesta inmune, inhibir el crecimiento tumoral o para alterar de forma medible los síntomas externos del tumor. Cuando se administra a un sujeto, generalmente se usará una dosificación que conseguirá concentraciones en el tejido diana (por ejemplo, en linfocitos) que han demostrado conseguir un efecto *in vitro*.

55 Polinucleótido: El término polinucleótido o secuencia de ácido nucleico se refiere a una forma polimérica de nucleótido de al menos 10 bases de longitud. Un polinucleótido recombinante incluye un polinucleótido que no está inmediatamente contiguo con las dos secuencias codificantes con las que está inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que se obtiene. El término por lo tanto incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que está incorporado en un vector; en un plásmido de replicación autónoma o virus; o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota, o que existe en forma de una molécula separada (por ejemplo, un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, o formas modificadas de cualquier nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN.

60 Polipéptido: Cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación post-traduccional (por ejemplo, glucosilación o fosforilación). En una realización, el polipéptido es un polipéptido PAGE4. Un polipéptido puede ser entre 3 y 30 aminoácidos de longitud. En una realización, un polipéptido es de aproximadamente 7 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. En otra realización más, un polipéptido es de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos de longitud. En otra realización más, un péptido es de aproximadamente 9 aminoácidos de longitud. Con respecto a polipéptidos, "comprende" indica que pueden incluirse secuencias de aminoácidos adicionales u otras moléculas en la molécula, "consta esencialmente de" indica que no se incluyen secuencias de aminoácidos adicionales en la molécula, pero que pueden incluirse otros agentes (tales

como marcadores o compuestos químicos), y "consta de" indica que no se incluyen secuencias de aminoácidos adicionales ni agentes adicionales en la molécula.

5 Sondas y cebadores: Una sonda comprende un ácido nucleico aislado unido a un marcador detectable o molécula informadora. Los cebadores son ácidos nucleicos cortos, preferiblemente oligonucleótidos de ADN, de aproximadamente 15 nucleótidos o más de longitud. Los cebadores pueden hibridarse con una cadena de ADN diana complementaria por hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, y después extenderse a lo largo de la cadena de ADN diana por una enzima ADN polimerasa. Pueden usarse pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica. Los especialistas en la técnica apreciarán que la especificidad de una sonda o cebador particular aumenta con su longitud. Por tanto, por ejemplo, un cebador que comprende 20 nucleótidos consecutivos hibridará con una diana con una especificidad mayor que un cebador correspondiente de solamente 15 nucleótidos. Por tanto, para obtener mayor especificidad, pueden seleccionarse sondas y cebadores que comprenden aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos consecutivos.

15 Purificado: Los epítomos de PAGE4 descritos en este documento pueden purificarse (y/o sintetizarse) por cualquier medio conocido en la técnica (véase, por ejemplo, *Guide to Protein Purification*, ed. Deutscher, *Meth. Enzymol.* 185, Academic Press, San Diego, 1990; y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer Verlag, Nueva York, 1982). Purificación sustancial se refiere a la purificación entre otras proteínas o componentes celulares. Una proteína sustancialmente purificada es al menos aproximadamente un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% pura. Por tanto, en un ejemplo no limitante específico, una proteína sustancialmente purificada está un 90% libre de otras proteínas o componentes celulares.

25 Por tanto, el término purificado no requiere pureza absoluta; en su lugar, se entiende como un término relativo. Por ejemplo, un ácido nucleico purificado es uno en el que el ácido nucleico está más enriquecido que el ácido nucleico en su entorno natural dentro de una célula. En realizaciones adicionales, un ácido nucleico o preparación celular se purifica de tal modo que el ácido nucleico o célula represente al menos aproximadamente el 60% (tal como, aunque sin limitación, el 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99%) del ácido nucleico o contenido celular total de la preparación, respectivamente.

30 RANTES (CCL5): Una citoquina que es un miembro de la superfamilia de citoquinas de interleuquina-8. Se cree que RANTES es un atrayente selectivo para linfocitos T de memoria y monocitos. RANTES se une a CCR5 (un co-receptor de VIH).

35 Recombinante: Un ácido nucleico recombinante es uno que tiene una secuencia que no es de origen natural o que tiene una secuencia que se ha creado por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia de lo contrario separados. Esta combinación artificial a menudo se consigue por síntesis química o, más habitualmente, por la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, por técnicas de ingeniería genética.

Hibridación selectiva: Hibridación en condiciones de rigurosidad moderada o elevada que excluye secuencias de nucleótidos no relacionadas.

40 En reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones usadas para conseguir un nivel particular de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se están hibridando. Por ejemplo, la longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido de GC frente a AT), y el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN frente a ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos pueden considerarse en la selección de las condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.

45 Un ejemplo específico de condiciones de rigurosidad progresivamente más elevadas es el siguiente: SSC 2x/SDS al 0,1% a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de hibridación); SSC 0,2x/SDS al 0,1% a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de baja rigurosidad); SSC 0,2x/SDS al 0,1% a aproximadamente 42°C (condiciones de rigurosidad moderada); y SSC 0,1x a aproximadamente 68°C (condiciones de elevada rigurosidad). Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente variaciones sobre estas condiciones (por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). El lavado puede realizarse usando solamente una de estas condiciones, por ejemplo, condiciones de elevada rigurosidad, o puede usarse cada una de las condiciones, por ejemplo, durante 10-15 minutos cada una, en el orden enumerado anteriormente, repitiendo cualquier o todas las etapas enumeradas. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las condiciones óptimas variarán, dependiendo de la reacción de hibridación particular implicada, y pueden determinarse empíricamente.

55 Identidad de secuencia: La similitud entre secuencias de aminoácidos se expresa en términos de la similitud entre las secuencias, mencionada de otro modo como identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide frecuentemente en términos del porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes de un polipéptido PAGE4 tendrán un grado relativamente elevado de identidad de secuencia cuando se alinean usando métodos convencionales.

60 Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Higgins y Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988. Altschul et al., *Nature Genet.* 6:119, 1994, presenta una consideración detallada de métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología.

65

La NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mai. Biol.* 215:403, 1990) está disponible en varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para su uso en conexión con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Está disponible una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa en el sitio web del NCBI en Internet.

Los homólogos y variantes de un polipéptido PAGE4 típicamente están caracterizados porque tienen al menos un 75%, por ejemplo al menos un 80%, de identidad de secuencia contada sobre la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de PAGE4 usando NCBI Blast 2.0, blastp de huecos ajustado a los parámetros por defecto. Para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función Blast 2 sequences usando la matriz BLOSUM62 por defecto ajustada a los parámetros por defecto, (la existencia de un hueco tiene un valor de 11, y un hueco por resto tiene un valor de 1). Cuando se alinean péptidos cortos (menos de aproximadamente 30 aminoácidos), la alineación debe realizarse usando la función Blast 2 sequences, empleando la matriz PAM30 ajustada a los parámetros por defecto (penalizaciones de abertura de hueco 9, extensión de hueco 1). Proteínas con inclusión mayor similitud a las secuencias de referencia mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se evalúan por este método, tales como al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, o al menos el 99% de identidad de secuencia. Cuando se está comparando menos de la secuencia completa para la identidad de secuencia, los homólogos y variantes típicamente tendrán al menos un 80% de identidad de secuencia sobre cortas ventanas de 10-20 aminoácidos, y pueden tener identidades de secuencia de al menos el 85% o al menos el 90% o el 95% dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de secuencia sobre dichas cortas ventanas están disponibles en el sitio web del NCBI en Internet. Los especialistas en la técnica apreciarán que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan solamente como directrices; es completamente posible que pudieran obtenerse homólogos muy significativos que estén fuera de los intervalos proporcionados.

Agente de unión específica: Un agente que se une sustancialmente sólo a una diana definida. Por tanto, un agente de unión específica a PAGE4 es un agente que se une sustancialmente a un polipéptido PAGE4. En una realización, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a PAGE4.

Célula T: Un glóbulo blanco crítico para la respuesta inmune. Las células T incluyen, aunque sin limitación, células T CD4+ y células T CD8+. Un linfocito T CD4+ es una célula inmune que lleva un marcador sobre su superficie conocido como "grupo de diferenciación 4" (CD4). Estas células, también conocidas como células T auxiliares, ayudan a organizar la respuesta inmune, incluyendo respuestas de anticuerpos así como respuestas de células T asesinas. Las células T CD8+ llevan el marcador del "grupo de diferenciación 8" (CD8). En una realización, una célula T CD8 es un linfocito T citotóxico. En otra realización, una célula CD8 es una célula T supresora.

Polipéptido terapéuticamente activo: Un agente, tal como un epítipo de PAGE4 que causa inducción de una respuesta inmune, medida por la respuesta clínica (por ejemplo, el aumento en una población de células inmunes, actividad citolítica aumentada contra células que expresan PAGE4, o reducción medible de la carga tumoral). Las moléculas terapéuticamente activas también pueden prepararse a partir de ácidos nucleicos. Ejemplos de una molécula terapéuticamente activada basada en ácido nucleico es una secuencia de ácido nucleico que codifica un epítipo PAGE4, donde la secuencia de ácido nucleico está unida de forma funcional a un elemento de tal como un promotor.

En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un epítipo de PAGE4 es una cantidad usada para generar una respuesta inmune, o para tratar el cáncer de próstata o el cáncer de mama en un sujeto. Tratamiento se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de un cáncer reproductor, o una reducción en la carga tumoral.

Transducida: Una célula transducida es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico por técnicas de biología molecular. Como se usa en este documento, el término transducción abarca todas las técnicas por las cuales puede introducirse una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo transfección con vectores virales, transformación con vectores plasmídicos, e introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección, y aceleración de proyectiles de partícula.

Vector: Una molécula de ácido nucleico que introducida en una célula hospedadora, produce de este modo una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación. A vector también puede incluir uno o más genes marcadores de selección y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Los vectores incluyen vectores plasmídicos, incluyendo plásmidos para la expresión en células bacterianas gram negativas y gram positivas. Los vectores ejemplares incluyen aquellos para su expresión en *E. coli* y *Salmonella*. Los vectores también incluyen vectores virales, tales como, aunque sin limitación, vectores de retrovirus, orthopoxvirus, avipoxvirus, fowlpoxvirus, capripoxvirus, suipoxvirus, adenovirus, herpesvirus, alfavirus, baculovirus, virus Sindbis, virus vaccinia y poliovirus.

Salvo que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por los especialistas en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Asimismo, se entiende que la palabra "o" incluye "y" salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Debe entenderse adicionalmente que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para descripción. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de esta descripción, a continuación se describen método y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". En caso de conflicto, predominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de términos. Además, los materiales,

métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Péptidos PAGE4 Inmunogénicos

5 PAGE4 es un polipéptido que se transcribe en células de próstata, en células cancerosas de próstata, en el cuello del útero y en muchos cánceres uterinos. PAGE4 se describe en la solicitud PCT publicada N° WO 00/12706, publicada el 9 de marzo de 2000 (Pastan et al.).

En una realización, el polipéptido tiene una secuencia expuesta como:

MSARVRSRSRGRGDGX₁X₂APDVVAFVAPGESQQEPPPTDNQDIEPGQEREGTPPIEERKX₃X₄GDCQEMDX₅EKIRS
ERGDGSDVKEKX₆X₇PPNPKHX₈KTKEAGDGQP (SEC ID N° 1)

Una secuencia de aminoácidos ejemplar se expone en la solicitud PCT publicada N° WO 00/12706, como:

10 MSARVRSRSRGRGDGQEAPDVVAFVAPGESQQEPPPTDNQDIEPGQEREGTPPIEERKVEGDCQEMDLEKTRSER
GDGSDVKEKTPPNPKHAKTKEAGDGQP (SEC ID N° 2); véase también el número de acceso a GENBANK
AF275258.

15 En otras realizaciones, PAGE4 tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a la SEC ID N° 2, por ejemplo, un polipéptido que tiene aproximadamente un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o incluso mayor identidad de secuencia con la SEC ID N° 2. Se han descrito variantes adicionales (véase a continuación y véase la solicitud PCT publicada N° WO 00/12709, incorporada en este documento por referencia, para una descripción completa de estos polipéptidos. Véase también el número de acceso a GENBANK AF275258.

20 Usando el código genético, un especialista en la técnica puede producir fácilmente una secuencia de ácido nucleico que codifica PAGE4. En un ejemplo, el PAGE4 está codificado por un ácido nucleico que tiene una secuencia expuesta como:

ggtcgacct cgccaggctc tctgctgact caagttcttc agttcacgat
cttctagttg cagcagatgag tgcacgagtg agatcaagat ccagaggaag
aggagatggt caggaggctc cccgatgtgtg tgcattcgtg gctccccgtg
aatctcagca agaggaacca ccaactgaca atcaggatat tgaacctgga
25 caagagagag aaggaacacc tccgatcgaa gaacgtaaag tagaaggatga
ttgccaggaa atggatctgg aaaagactcg gaggtagcgt ggagatggct
ctgatgtaaa agagaagact ccacctaatic taagactaa
gaagcaggag atgggcagcc ataagttaa aagaagacaa gctgaagcta
cacacatggc tgatgtcaca ttggaatgt gactgaaaat ttggaattc

30 tctcaataga gtctgagttt tctctgaaga aaaaaaaaaa a
(SEC ID N° 3),

(véase también la publicación PCT N° WO 00/12709 (Pastan et al.), y el número de acceso a GENBANK AF277258.

35 Pueden sintetizarse químicamente fragmentos inmunogénicos de PAGE4 (y el propio PAGE4), por métodos convencionales. Si se desea, los polipéptidos también pueden sintetizarse químicamente por tecnologías emergentes. Uno de dichos procesos se describe en W. Lu et al., *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 429:31-35, 1998. Los polipéptidos también pueden producirse usando técnicas de genética molecular, tal como insertando de un ácido nucleico que codifica PAGE4 o un epítipo del mismo en un vector de expresión, introduciendo el vector de expresión en una célula hospedadora, y aislando el polipéptido (véase a continuación).

40 En este documento se describen polipéptidos PAGE4 inmunogénicos. Estos péptidos comprenden como mucho diez aminoácidos, tal como nueve aminoácidos consecutivos de un polipéptido PAGE4, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como:

MSARVRSRSRGRGDGX₁X₂APDVVAFVAPGESQQEPPPTDNQDIEPGQEREGIPPIEERKX₃X₄GDCQEMDX₅EKTRS
ERGDGSDVKEKX₆X₇PPNPKHX₈KTKEAGDGQP (SEC ID N° 1, PAGE4 CONSENSO QUE MUESTRA
SUSTITUCIONES)

45 donde X₁ es Q o Y, X₂ es E o L, X₃ es V o Y, X₄ es E o L, X₅ es V o L, X₆ es K o Y, X₇ es T o L, y X₈ es A o V.

En varias realizaciones, el polipéptido PAGE4 comprende nueve aminoácidos de la SEC ID N° 1. Por tanto, el polipéptido comprende uno de (a) los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1, (b) los aminoácidos 59 a 68 de la SEC ID N° 1, o (c) los aminoácidos 84 a 92 de la SEC ID N° 1 y no incluye aminoácidos consecutivos adicionales de la secuencia expuesta como SEC ID N° 1.

50 Los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos descritos en este documento no incluyen todos los aminoácidos consecutivos adicionales de la SEC ID N° 1. En una realización, el polipéptido no incluye los aminoácidos 1-15 de la

SEC ID N° 1.

5 Sin limitarse por la teoría, se cree que la presentación de péptidos por moléculas MHC de clase I implica la unión a la hendidura en una molécula MHC de clase I a través de los restos de anclaje del péptido y su presentación final sobre la superficie celular. Dependiendo de los restos de anclaje particulares, entre otras cosas, ciertos péptidos pueden unirse más fuertemente a moléculas HLA particulares que a otras. Los péptidos que se unen bien habitualmente son epítomos "dominantes", mientras que aquellos que se unen menos bien a menudo son epítomos "subdominantes" o "crípticos". Los epítomos dominantes de proteínas propias o proteínas foráneas provocan potente tolerancia o potentes respuestas inmunes. Los epítomos subdominantes o crípticos generan respuestas débiles o ausencia de respuesta alguna. Sin limitarse por la teoría, la unión más fuerte por epítomos dominantes a moléculas HLA provoca su presentación más densa sobre la superficie celular, mayor oportunidad de reaccionar con células inmunes y mayor probabilidad de provocar una respuesta inmune o tolerancia. Las moléculas MHC de clase I presentan epítomos de proteínas endógenas para su presentación a células CTL. Las moléculas HLA A, HLA B y HLA C se unen a péptidos de aproximadamente ocho a diez aminoácidos de longitud (tal como nueve aminoácidos de longitud) que tienen restos de anclaje particulares. Los restos de anclaje reconocidos por una molécula HLA de clase I dependen de la forma alélica particular de la molécula HLA. Una célula T CD8+ alberga receptores de células T que reconocen un epítomo específico cuando se presenta por una molécula HLA particular en una célula. Cuando un precursor CTL que se ha estimulado por una célula presentadora de antígeno para convertirse en un linfocito T citotóxico contacta con una célula que alberga dicho complejo HLA-péptido, el CTL forma un conjugado con la célula y la destruye. En varios ejemplos presentados en este documento, los polipéptidos que se describen se unen a y se presentan por HLA-A2.1.

10 En varios ejemplos, el polipéptido PAGE4 inmunogénico puede estar repetido, de modo que el polipéptido incluye varias copias del polipéptido PAGE4 inmunogénico. Sin embargo, solamente una copia del polipéptido PAGE4 inmunogénico puede incluirse en el péptido inmunogénico.

15 En una realización, un polipéptido PAGE4 inmunogénico incluye, consta esencialmente de, o consta de los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1. Por ejemplo, el polipéptido PAGE4 inmunogénico puede incluir, constar esencialmente de o constar de los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1, donde el aminoácido 1 (X_1) es una glutamina y el aminoácido 2 (X_2) es un ácido glutámico (P16 y 16-1). El polipéptido PAGE4 inmunogénico puede incluir, constar esencialmente de o constar de los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1, donde el aminoácido 1 (X_1) es una glutamina y el aminoácido 2 (X_2) es una leucina (P16-1). El polipéptido PAGE4 inmunogénico puede incluir, constar esencialmente de o constar de los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1, donde el aminoácido 1 (X_1) es una tirosina y el aminoácido 2 (X_2) es una leucina (P16-2). En varios ejemplos, se incluyen dos, tres, cuatro, cinco copias del polipéptido PAGE4 inmunogénico en una molécula inmunogénica. Las copias del polipéptido PAGE4 inmunogénico pueden estar separadas por enlazadores peptídicos.

20 En otra realización, el polipéptido PAGE4 inmunogénico incluye, consta esencialmente de, o consta de los aminoácidos 59-68 de la SEC ID N° 1 (P59). Por ejemplo, el polipéptido PAGE4 inmunogénico puede incluir, constar esencialmente de, o constar de los aminoácidos 59-68 de la SEC ID N° 1, donde el aminoácido 1 (X_3) es una valina y el aminoácido 2 (X_4) es una leucina (P-59-1). El polipéptido PAGE4 inmunogénico puede incluir, constar esencialmente de, o constar de los aminoácidos 59-68 de la SEC ID N° 1, donde el aminoácido 1 (X_3) es una tirosina, el aminoácido 2 (X_4) es una leucina, y el aminoácido 3 (X_5) es una valina.

25 En una realización adicional, el polipéptido PAGE4 inmunogénico puede incluir, constar esencialmente de, o constar de los aminoácidos 84-92 de la SEC ID N° 1. Por ejemplo, el polipéptido PAGE4 inmunogénico puede incluir, constar esencialmente de, o constar de los aminoácidos 84-92 de la SEC ID N° 1, donde el aminoácido 1 (X_6) es una tirosina, el aminoácido 2 (X_7) es una leucina y el aminoácido 9 (X_8) es una valina.

30 En ejemplos adicionales, el polipéptido puede ser una proteína de fusión y también puede incluir secuencias heterólogas a PAGE4 (tales como secuencias de aminoácidos de al menos nueve aminoácidos de longitud que no están incluidas en la SEC ID N° 1). Por tanto, en varios ejemplos no limitantes específicos, el péptido inmunogénico es un polipéptido de fusión, por ejemplo, el polipéptido incluye seis restos de histidina secuenciales, una secuencia de aminoácidos de β -galactosidasa, o una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina. El polipéptido también puede unirse covalentemente a un vehículo. Los vehículos adecuados incluyen, aunque sin limitación, una proteína de envuelta pequeña del virus de la hepatitis B (HBsAg). Esta proteína tiene la capacidad de autoensamblarse en agregados y puede formar partículas tipo virus. La preparación de HBsAg está bien documentada, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea N° EP-A-0 226 846, la publicación de solicitud de patente europea N° EP-A-0 299 108 y la publicación PCT N° WO 01/117554, y la secuencia de aminoácidos se describe, por ejemplo, en Tiollais et al., Nature, 317: 489, 1985, y la publicación de patente europea N° EP-A-0 278 940, y la publicación PCT N° WO 91/14703.

35 Como se ha indicado anteriormente, el polipéptido puede incluir opcionalmente repeticiones de uno o más de los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos descritos en este documento. En un ejemplo no limitante específico, el polipéptido incluye dos, tres, cuatro, cinco, o hasta diez repeticiones de uno de los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos. En ejemplos adicionales, el polipéptido incluye dos, tres, cuatro, cinco o hasta diez repeticiones de dos o tres de los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos descritos en este documento. Puede incluirse opcionalmente una secuencia enlazadora entre los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos. En todos estos ejemplos, el polipéptido no incluye la secuencia de aminoácidos de PAGE4 de longitud completa, tal como la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1.

40 Los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos descritos en este documento pueden sintetizarse químicamente por métodos convencionales, o pueden producirse de forma recombinante. Un proceso ejemplar para la producción de polipéptido se describe en Lu et al., *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 429:31-35, 1998. También se pueden aislar por métodos que incluyen cromatografía preparativa y separaciones inmunológicas.

Un polipéptido PAGE4 inmunogénico puede unirse covalentemente a un vehículo, que es una macromolécula inmunogénica a la que puede unirse una molécula antigénica. Cuando se une a un vehículo, el polipéptido unido llega a ser más inmunogénico. Los vehículos se eligen para aumentar la inmunogenicidad de la molécula unida y/o para provocar títulos mayores de anticuerpos contra el vehículo que son beneficiosos de forma diagnóstica, analítica, y/o terapéutica. La unión covalente de una molécula a un vehículo puede conferir inmunogenicidad potenciada y dependencia de células T (véase Pozsgay et al., *PNAS* 96:5194-97, 1999; Lee et al., *J. Immunol.* 116:1711-18, 1976; Dintzis et al., *PNAS* 73:3671-75, 1976). Los vehículos útiles incluyen vehículos poliméricos, que pueden ser materiales naturales (por ejemplo, polisacáridos, polipéptidos o proteínas de bacterias o virus), semi-sintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales a los que puede unirse un resto reactivo. También pueden usarse productos bacterianos y proteína virales (tales como el antígeno de superficie y el antígeno central del virus de la hepatitis B) como vehículos, así como proteínas de organismos superiores tales como hemocianina de lapa californiana, hemocianina de cangrejo bayoneta, edestina, albúminas séricas de mamífero, e inmunoglobulinas de mamífero. Productos bacterianos adicionales para su uso como vehículos incluyen proteínas de la pared bacteriana y otros productos (por ejemplo, paredes celulares de estreptococos o estafilococos y lipopolisacárido (LPS)).

También se proporcionan polinucleótidos que codifican los polipéptidos PAGE4 inmunogénicos descritos en este documento. Estos polinucleótidos incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN que codifican el polipéptido de interés. Se producen mutaciones silenciosas en la secuencia codificante debido a la degeneración (es decir, redundancia) del código genético, por lo cual más de un codón puede codificar el mismo resto aminoacídico. Por tanto, por ejemplo, la leucina puede estar codificada por CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, o TTG; la serina puede estar codificada por TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, o AGC; la asparagina puede estar codificada por AAT o AAC; el ácido aspártico puede estar codificado por GAT o GAC; la cisteína puede estar codificada por TGT o TGC; la alanina puede estar codificada por GCT, GCC, GCA, o GCG; la glutamina puede estar codificada por CAA o CAG; la tirosina puede estar codificada por TAT o TAC; y la isoleucina puede estar codificada por ATT, ATC, o ATA. Pueden encontrarse tablas que muestran el código genético convencional en diversas fuentes (por ejemplo, L. Stryer, 1988, *Biochemistry*, 3ª Edición, W.H. Freeman and Co., NY).

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico puede clonar o amplificarse por métodos *in vitro*, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia auto-sostenido (3SR) y el sistema de amplificación con replicasa Q β (QB). Por ejemplo, un polinucleótido que codifica la proteína puede aislarse por reacción en cadena de la polimerasa de ADNc usando cebadores basados en la secuencia de ADN de la molécula. Los especialistas en la técnica conocen una amplia diversidad de metodologías de clonación y amplificación *in vitro*. Los métodos de PCR se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.683.195; Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263, 1987; y Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989). Los polinucleótidos también pueden aislarse por exploración de bibliotecas genómicas o de ADNc con sondas seleccionadas entre las secuencias del polinucleótido deseado en condiciones de hibridación rigurosas.

Los polinucleótidos que codifican un polipéptido PAGE4 inmunogénico incluyen un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota, o que existe como una molécula separada (tal como un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos de la invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, o formas modificadas de cualquier nucleótido. El término incluye formas sencillas y dobles de ADN.

En una realización, se usan vectores para la expresión de péptidos PAGE4 en levaduras tales como *S. cerevisiae* o *Kluyveromyces lactis*. Se conocen varios promotores para usarlos en sistemas de expresión de levaduras tales como los promotores constitutivos de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (*PMA1*), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GPD*), fosfoglicerato quinasa-1 (*PGK1*), la alcohol deshidrogenasa-1 (*ADH1*) y la bomba resistente a fármacos pleiotrópicos (*PDR5*). Además, son de uso muchos promotores inducibles, tales como *GAL1-10* (inducido por galactosa), *PHO5* (inducido por fosfato inorgánico extracelular bajo), y elementos *HSE* de choque por calor en tándem (inducidos por elevación de la temperatura a 37°C). Los promotores que dirigen la expresión variable en respuesta a un inductor valorable incluyen los promotores *MET3* y *MET25* sensibles a metionina y los promotores *CUP1* dependientes de cobre. Cualquiera de estos promotores puede clonarse en plásmidos de múltiples copias (2 μ) o de única copia (*CEN*) para dar un nivel adicional de control en el nivel de expresión. Los plásmidos pueden incluir marcadores de nutricionales (tales como *URA3*, *ADE3*, *HIS1*, y otros) para la selección en levaduras y resistencia a antibióticos (*AMP*) para propagación en bacterias. Se conocen plásmidos para la expresión en *K. lactis*, tales como pKLAC1. Por tanto, en un ejemplo, después de la amplificación en bacterias, los plásmidos pueden introducirse en los auxótrofos de levadura correspondientes por métodos similares a transformación bacteriana.

Los péptidos PAGE4 pueden expresarse en una diversidad de cepas de levadura. Por ejemplo, se han delecionado simultáneamente siete transportadores resistentes a fármacos pleiotrópicos, *YOR1*, *SNQ2*, *PDR5*, *YCF1*, *PDR10*, *PDR11*, y *PDR15*, junto con sus factores de transcripción activadores, *PDR1* y *PDR3*, en células hospedadoras de levadura, volviendo a la cepa resultante sensible a fármacos. También pueden utilizarse cepas de levadura con composición lipídica alterada de la membrana plasmática, tales como el mutante *erg6* deficiente en biosíntesis de ergosterol. Pueden expresarse proteínas que son altamente sensibles a proteólisis en levaduras que carecen de la endopeptidasa vacuolar maestra Pep4, que controla la activación de otras hidrolasas vacuolares. Puede emplearse la expresión heteróloga en cepas que llevan alelos sensibles a la temperatura (*ts*) de los genes si el mutante nulo correspondiente es inviable.

Se han construido varios vectores virales, incluyendo poliomavirus, es decir, SV40 (Madzak et al., 1992, *J. Gen. Virol.*, 73:1533-1536), adenovirus (Berkner, 1992, *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:39-6; Berliner et al., 1988, *Bio Techniques*, 6:616-629; Gorziglia et al., 1992, *J. Virol.*, 66:4407-4412; Quantin et al., 1992, *Proc. Nad. Acad. Sci. USA*, 89:2581-2584; Rosenfeld et al., 1992, *Cell*, 68:143-155; Wilkinson et al., 1992, *Nucl. Acids Res.*, 20:2233-2239;

Stratford-Perricaudet et al., 1990, *Hum. Gene Ther.*, 1:241-256), virus vaccinia (Mackett et al., 1992, *Biotechnology*, 24:495-499), virus adeno-asociados (Muzyczka, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:91-123; On et al., 1990, *Gene*, 89:279-282), herpesvirus incluyendo HSV y EBV (Margolskee, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:67-90; Johnson et al., 1992, *J. Virol.*, 66:2952-2965; Fink et al., 1992, *Hum. Gene Ther.* 3:11-19; Breakfield et al., 1987, *Mol. Neurobiol.*, 1:337-371; Fresse et al., 1990, *Biochem. Pharmacol.*, 40:2189-2199), virus Sindbis (H. Herweijer et al., 1995, *Human Gene Therapy* 6:1161-1167; patentes de Estados Unidos N° 5.091.309 y 5.2217.879), alfavirus (S. Schlesinger, 1993, *Trends Biotechnol.* 11:18-22; I. Frolov et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11371-11377) y retrovirus de origen aviar (Brandypadhyay et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4:749-754; Petropoulos et al., 1992, *J. Virol.*, 66:3391-3397), murino (Miller, 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:1-24; Miller et al., 1985, *Mol. Cell Biol.*, 5:431-437; Sorge et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4:1730-1737; Mann et al., 1985, *J. Virol.*, 54:401-407), y humano (Page et al., 1990, *J. Virol.*, 64:5370-5276; Buchschalcher et al., 1992, *J. Virol.*, 66:2731-2739). También se conocen vectores de baculovirus (virus de la polihedrosis multinuclear de *Autographa californica*; AcMNPV) en la técnica, y pueden obtenerse de fuentes comerciales (tales como PharMingen, San Diego, Calif.; Protein Sciences Corp, Metiden, Conn.; Stratagene La Jolla, Calif).

En una realización, el polinucleótido que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico se incluye en un vector viral. Los vectores adecuados incluyen vectores de retrovirus, vectores de orthopoxvirus, vectores de avipoxvirus, vectores de fowlpoxvirus, vectores de capripoxvirus, vectores de suipoxvirus, vectores adenovirales, vectores de herpesvirus, vectores de alfavirus, vectores de baculovirus, vectores de virus Sindbis, vectores de virus vaccinia y vectores de poliovirus. Vectores ejemplares específicos son vectores de poxvirus tales como virus vaccinia, fowlpoxvirus y un virus vaccinia altamente atenuado (MVA), adenovirus, baculovirus y similares.

Los poxvirus útiles en la práctica de la presente invención incluyen orthopox, suipox, avipox, y capripoxvirus. Los orthopox incluyen vaccinia, ectromelia, y la viruela del mapache. Un ejemplo de un orthopox de uso es vaccinia. Los avipox incluyen fowlpox, viruela del canario y viruela de la paloma. Los capripox incluyen la viruela de la cabra y la viruela de la oveja. En un ejemplo, el suipox es la viruela del cerdo. Ejemplos de vectores poxvirales para la expresión se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6.165.460. Otros vectores virales que pueden usarse incluyen otros virus ADN tales como herpesvirus y adenovirus, y virus ARN tales como retrovirus y poliovirus.

En algunos casos, los vectores virales vaccinia pueden provocar una fuerte respuesta de anticuerpos. Por tanto, aunque son posibles numerosos refuerzos con vectores vaccinia, su uso repetido puede no usarse en ciertos casos. Sin embargo, este problema de sensibilidad puede minimizarse usando poxvirus de diferente género para los refuerzos. En un ejemplo, cuando el primer vector poxviral o inicial es vaccinia, el segundo y posteriores vectores poxvirales se seleccionan entre los poxvirus de un género diferente tal como suipox, avipox, capripox o un orthopox inmunogénicamente distinto de vaccinia.

El genoma de virus vaccinia es conocido en la técnica. Está compuesto por una región HIND F13L, una región TK, y una región HA. Se ha usado virus vaccinia recombinante para incorporar un gen exógeno para la expresión del producto génico exógeno (véase, por ejemplo, Perkus et al. *Science* 229:981-984, 1985; Kaufman et al. *Int. J. Cancer* 48:900-907, 1991; Moss *Science* 252:1662, 1991). Un gen codificante de un antígeno de interés, tal como un polipéptido PAGE4 inmunogénico, puede incorporarse en la región HIND F13L o, como alternativa, puede incorporarse en la región TK del vector viral vaccinia recombinante (u otras regiones no esenciales del genoma del virus vaccinia). Baxby y Paoletti (*Vaccine* 10:8-9, 1992) describen la construcción y uso como vector, del poxvirus no replicante, incluyendo el virus de la viruela del canario, el virus de la viruela de las aves de corral y otras especies de aves. 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 uso como vector, del virus Ankara recombinante no replicante (MVA, vaccinia modificada Ankara).

Se describen vectores adecuados, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6.998.252. En un ejemplo, un poxvirus recombinante, tal como un virus vaccinia recombinante se modifica sintéticamente por inserción de un gen quimérico que contiene secuencias reguladoras de vaccinia o secuencias de ADN funcionalmente equivalentes a las mismas que flanquean secuencias de ADN que de forma natural no están contiguas con las secuencias de ADN reguladoras de vaccinia flanqueantes que codifican un polipéptido PAGE4 inmunogénico. El virus recombinante que contiene dicho gen quimérico es eficaz en la expresión del polipéptido PAGE4 inmunogénico. En un ejemplo, el vector viral vaccinia comprende (A) un segmento compuesto por (i) una primera secuencia de ADN que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico y (ii) un promotor de poxvirus, donde el promotor de poxvirus está adyacente a y ejerce control transcripcional sobre la secuencia de ADN que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico; y, flanqueando dicho segmento, (B) ADN de una región no esencial de un genoma de poxvirus. El vector viral puede codificar un marcador de selección. En un ejemplo, el poxvirus incluye, por ejemplo, un gen de timidina quinasa (véase la patente de Estados Unidos N° 6.998.252).

Los vectores poxvirales que codifican un polipéptido PAGE4 inmunogénico incluyen al menos un elemento de control de la expresión unido de forma funcional a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido PAGE4. Los elementos de control de la expresión se insertan en el vector poxviral para controlar y regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Los ejemplos de elementos de control de la expresión de uso en estos vectores incluyen, aunque sin limitación, el sistema lac, las regiones operadora y promotora del fago lambda, promotores de levaduras y promotores derivados de poliomavirus, adenovirus, retrovirus o SV40. Elementos de funcionamiento adicionales incluyen, aunque sin limitación, la secuencia líder, codones de terminación, señales de poliadenilación y otras secuencias necesarias o preferidas para la transcripción apropiada y posterior traducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido PAGE4 inmunogénico en el sistema hospedador. El vector de expresión puede contener elementos adicionales necesarios para la transferencia y posterior replicación del vector de expresión que contiene la secuencia de ácido nucleico en el sistema hospedador. Ejemplos de dichos elementos incluyen, aunque sin limitación, orígenes de replicación y marcadores de selección. Los especialistas en la técnica entenderán adicionalmente que dichos vectores se construyen fácilmente usando métodos convencionales (Ausubel et al., (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y.) y están disponibles en el mercado.

Las técnicas básicas para preparar virus ADN recombinantes que contienen una secuencia de ADN heterólogo que codifica el polipéptido PAGE4 inmunogénico, son conocidas en la técnica. Dichas técnicas implican, por ejemplo, la recombinación homóloga entre las secuencias de ADN viral que flanquean la secuencia de ADN en un plásmido donante y secuencias homólogas presentes en el virus parental (Mackett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415-7419). En particular, pueden usarse vectores virales recombinantes tal como un vector poxviral para suministrar el gen. El vector puede construirse, por ejemplo, por etapas conocidas en la técnica, tales como etapas análogas a los métodos para crear recombinantes sintéticos del fowlpoxvirus descrito en la patente de Estados Unidos Nº 5.093.258. Otras técnicas incluyen usar un sitio de endonucleasa de restricción único que está presente de forma natural o se inserta artificialmente en el vector viral parental para insertar el ADN heterólogo.

Generalmente, un vector donante de ADN contiene los siguientes elementos: (i) un origen de replicación procariótico, de modo que el vector puede amplificarse en un hospedador procariota; (ii) un gen que codifica un marcador que permite la selección de células hospedadoras procariotas que contiene el vector (por ejemplo, un gen que codifica resistencia a antibióticos); (iii) al menos una secuencia de ADN que codifica el polipéptido PAGE4 localizada adyacente a un promotor transcripcional capaz de dirigir la expresión de la secuencia; y (iv) secuencias de ADN homólogas a la región del genoma del virus parental donde ser insertará el o los genes foráneos, flanqueando la construcción del elemento (iii). Se describen métodos para construir plásmidos donantes para la introducción de múltiples genes foráneos en poxvirus en el documento WO91/19803.

Generalmente, los fragmentos de ADN para la construcción del vector donante, incluyendo fragmentos que contienen promotores transcripcionales y fragmentos que contienen secuencias homólogas a la región del genoma del virus parental en la que tienen que insertarse las secuencias de ADN foráneo, pueden obtenerse de fragmentos de ADN genómico o ADN clonado. Los plásmidos donantes pueden ser mono, di, o multivalentes (es decir, pueden contener una o más secuencias de ADN foráneo insertadas). El vector donante puede contener un gen adicional que codifica un marcador que permitiría la identificación de virus recombinantes que contienen ADN foráneo insertado. Pueden usarse varios tipos de genes marcadores para permitir la identificación y aislamiento de virus recombinantes. Éstos incluyen genes que codifican resistencia a antibióticos o agentes químicos (por ejemplo, véase Spiropoulos et al., 1988, J. Virol. 62:1046; Falkner y Moss, 1988, J. Virol 62:1849; Franke et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1918), así como genes tales como el gen *lacZ* de *E. coli*, que permiten la identificación de placas virales recombinantes por ensayo colorimétrico (Panicali et al., 1986, Gene 47:193-199).

La secuencia génica de ADN a insertar en el virus puede colocarse en un plásmido donante, tal como una construcción plasmídica de *E. coli* o *Salmonella*, en la que se ha insertado el ADN homólogo a una sección de ADN tal como la del sitio de inserción del poxvirus donde tiene que insertarse el ADN. Por separado, la secuencia génica de ADN a insertarse se liga a un promotor. La unión promotor-gen se coloca en la construcción plasmídica de modo que la unión promotor-gen esté flanqueada en ambos extremos por ADN homólogo a una secuencia de ADN que flanquea una región del ADN pox que es la región de inserción deseada. Dentro de un vector poxviral parental, se usa un promotor pox. La construcción plasmídica resultante después se amplifica por cultivo dentro de bacterias *E. coli* y se aísla. A continuación, el plásmido aislado que contiene la secuencia génica de ADN a insertar se introduce por transfección en un cultivo celular, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de pollo, junto con el virus parental, por ejemplo, poxvirus. La recombinación entre el ADN pox homólogo en el plásmido y el genoma viral respectivamente produce un poxvirus recombinante modificado por la presencia de la construcción promotor-gen en su genoma, en un sitio que no afecta a la viabilidad del virus.

Como se ha indicado anteriormente, la secuencia de ADN se inserta en una región (región de inserción), en el virus que no afecta a la viabilidad del virus del virus recombinante resultante. Los especialistas en la técnica pueden identificar fácilmente dichas regiones en un virus, por ejemplo, ensayando aleatoriamente segmentos del ADN viral para regiones que permitan la formación de recombinantes sin afectar de forma grave a la viabilidad del virus del recombinante. Una región que puede usarse fácilmente y está presente en muchos virus es el gen de la timidina quinasa (TK). El gen TK se ha encontrado en todos los genomas de poxvirus examinados, incluyendo leporipoxvirus (Upton et al., 1986, J. Virology 60:920); fibromavirus de Shope; capripoxvirus (Gershon et al., 1989, J. Gen. Virol. 70:525) de oveja de Kenia-1; orthopoxvirus (Weir et al., 1983, J. Virol. 46:530) vaccinia (Esposito et al., 1984, Virology 135:561); monkeypox y el virus de la variola (Hruby et al., 1983, PNAS 80:3411) vaccinia (Kilpatrick et al., 1985, Virology 143:399); el virus del tumor del mono de Yaba; avipoxvirus (Binns et al., 1988, J. Gen. Virol. 69:1275); fowlpoxvirus (Boyle et al., 1987, Virology 156:355); fowlpoxvirus (Schnitzlein et al., 1988, J. Virological Methods 20:341); fowlpoxvirus, quailpoxvirus; entomopoxvirus (Lytyyn et al., 1992, J. Gen. Virol. 73:3235-3240).

En vaccinia, además de la región TK, otras regiones de inserción incluyen, por ejemplo, el fragmento HindIII M. En fowlpoxvirus, además de la región TK, otras regiones de inserción incluyen, por ejemplo, el fragmento BamHI J (Jenkins et al., 1991, AIDS Research and Human Retroviruses 7:991-998), el fragmento ECORI-HindIII, el fragmento EcoRV-HindIII, el fragmento BamHI y el fragmento HindIII expuestos en la solicitud EPO Nº 0 308220 A1 (véase también Calvert et al., 1993, J. Virol. 67:3069-3076; Taylor et al., 1988, Vaccine 6:497-503; Spohner et al., 1990: Bournnell et al., 1990, J. Gen. Virol. 71:621-628).

En swinepoxvirus, los sitios de inserción incluyen la región del gen de la timidina quinasa. Además del requisito de que el gen se inserte en una región de inserción, la expresión satisfactoria del gen insertado por el poxvirus modificado requiere la presencia de un promotor unido de forma funcional al gen deseado. Generalmente, el promotor debe colocarse de modo que se localice cadena arriba del gen a expresar. Los promotores son bien conocidos en la técnica y pueden seleccionarse fácilmente dependiendo del hospedador y el tipo celular que se desea abordar. En un ejemplo, en poxvirus, se usaron promotores poxvirales, tales como los promotores de vaccinia 7.5K, 40K o promotores de fowlpoxvirus tales como FPV C1A. También pueden usarse elementos potenciadores en combinación para aumentar el nivel de expresión. Además, pueden utilizarse promotores inducibles.

La recombinación homóloga entre el ADN plasmídico donante y el ADN viral en una célula infectada provoca la formación de virus recombinantes que incorporan los elementos deseados. Las células hospedadoras apropiadas para recombinación *in vivo* generalmente son células eucariotas que pueden infectarse por el virus y

transfectarse por el vector plasmídico. Ejemplos de dichas células adecuadas para su uso con un poxvirus son fibroblastos embrionarios de pollo, células HuTK143 (humanas), y células CV-1 y BSC-40 (ambas de riñón de mono). La infección de células con poxvirus y la transfección de estas células con vectores plasmídicos se consiguen por técnicas convencionales en la técnica (véase la patente de Estados Unidos N° 4.603.112 y la publicación PCT N° WO89/03429).

Después de la recombinación *in vivo*, la descendencia viral recombinante puede identificarse por una de varias técnicas. Por ejemplo, si el vector donante de ADN está diseñado para insertar genes foráneos en el gen de la timidina quinasa (TK) del virus parental, los virus que contienen ADN integrado serán TK⁺ y pueden seleccionarse en base a esto (Mackett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415). Como alternativa, puede usarse la co-integración de un gen que codifica un gen marcador o indicador con el o los genes foráneos de interés, como se ha descrito anteriormente, para identificar la descendencia recombinante. Un gen indicador preferido es el gen lacZ de *E. coli*. Los virus recombinantes que expresan beta-galactosidasa pueden seleccionarse usando un sustrato cromogénico para la enzima (Panicali et al., 1986, Gene 47:193). Una vez se ha identificado un virus recombinante, puede usarse una diversidad de métodos bien conocidos para ensayar la expresión de la secuencia de PAGE4 inmunogénico codificada por el fragmento de ADN insertado. Estos métodos incluyen ensayo de placas oscuras (un inmunoensayo enzimático *in situ* realizado sobre placas virales), análisis de transferencia de Western, radioinmunoprecipitación (RIPA), e inmunoensayo enzimático (EIA).

Esta descripción abarca un virus recombinante que comprende más de un antígeno de interés para el propósito de tener una vacuna multivalente. Por ejemplo, el virus recombinante puede comprender el genoma viral o partes del mismo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido PAGE4 inmunogénico y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno superficial del virus de la hepatitis B.

En una realización, se proporciona una composición que incluye un virus recombinante que comprende un genoma del virus vaccinia o partes del mismo, la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico y un virus recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula inmunoestimuladora B7-1, sola o en combinación con la secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula inmunoestimuladora B7-2, o un virus recombinante que contiene los genes tanto para un antígeno tumoral como para una molécula inmunoestimuladora. Esta descripción también abarca un virus recombinante que comprende el polipéptido PAGE4 inmunogénico que se administra con un segundo virus recombinante que comprende el genoma viral o partes del mismo, y una o más secuencias de ácido nucleico que codifican una o más moléculas B7, tal como un virus vaccinia recombinante que expresa B7-1 y/o B7-2. En la patente de Estados Unidos N° 893.869 se describe que la rápida infección de células tumorales con estos virus recombinantes demuestra que el virus vaccinia puede expresar realmente estas proteínas y que son moléculas funcionales. Después de la transferencia de los ácidos nucleicos, los hospedadores inmunocompetentes rechazan tumores singénicos débilmente inmunogénicos que expresan estas moléculas recombinantes.

Por tanto, en un ejemplo, se describe un virus recombinante que es un virus vaccinia recombinante que contiene B7-1 y un virus vaccinia recombinante que contiene B7-2 (denominados rV-B7-1 y rV-B7-2, respectivamente); la composición puede incluir rV-B7-1 y/o rV-B7-2 en combinación con un polipéptido PAGE4 inmunogénico.

La molécula B7 incluye, aunque sin limitación, B7-1, B7-2 y similares y análogos de las mismas. El gen B7 puede clonarse a partir de fuentes de mamífero incluyendo, aunque sin limitación, tejidos de mamífero, bibliotecas genómicas o bibliotecas de ADNc, preferiblemente de fuentes murinas o humanas. Se cree que las moléculas co-estimuladoras de la familia B7 (concretamente B7-1, B7-2, y posiblemente B7-3) son miembros de la superfamilia de los genes de inmunoglobulina. Estas moléculas están presentes en macrófagos, células dendríticas, monocitos (células presentadoras de antígeno (APC)). Generalmente no sucede amplificación significativa de la respuesta inmune contra un antígeno dado sin co-estimulación (June et al. (*Immunology Today* 15:321-331, 1994); Chen et al. (*Immunology Today* 14:483-486); Townsend et al. (*Science* 259:368-370)). Freeman et al. (*J. Immunol* 143:2714-2722, 1989) informan de la clonación y secuenciación del gen B7-1. Azuma et al. (*Nature* 366:76-79, 1993) informan de la clonación y secuenciación del gen B7-2. Por tanto, en una realización, el gen B7-1 o el gen B7-2 se administra junto con el polipéptido PAGE4 inmunogénico. Se ha descrito la inserción de ácidos nucleicos que codifican B7-1 y B7-2 en virus vaccinia (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.893.869; esta patente de Estados Unidos también describe el uso de un ácido nucleico que codifica IL-2 en un virus vaccinia). Se ha depositado varios vectores que incluyen IL-2, B7-1 y B7-2 en la American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. El 3 de octubre de 1994 según los términos del Tratado de Budapest (por ejemplo, rV-CEA_nIL-2 (Denominación ATCC VR 2480), rV_mB7-2 (Denominación ATCC VR 2482); y rV_mB7-1 (Denominación ATCC VR 2483)).

Las secuencias de ADN que codifican un polipéptido PAGE4 inmunogénico pueden expresarse *in vitro* por transferencia de ADN en una célula hospedadora adecuada. La célula puede ser procarionta o eucarionta. El término también incluye cualquier descendencia de la célula hospedadora objeto. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica a la célula parental ya que puede haber mutaciones que suceden durante la replicación. Los métodos de transferencia estable, que significa que el ADN foráneo se mantiene de forma continua en el hospedador, son conocidos en la técnica.

Como se ha indicado anteriormente, una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico puede unirse de forma funcional a secuencias de control de la expresión. Una secuencia de control de la expresión unida de forma funcional a una secuencia codificante está ligada de tal modo que se consigue la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión incluyen, aunque sin limitación, promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) delante del gen que codifica la proteína, señales de corte y empalme para los intrones, el mantenimiento de la correcta fase de lectura de este gen para permitir la apropiada traducción del ARNm, y codones de parada, apropiados.

Los hospedadores pueden incluir organismos microbianos, de levaduras, de insectos y de mamíferos. Los métodos para expresar secuencias de ADN que tienen secuencias eucarióticas o virales en procariontes son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de células hospedadoras adecuadas incluyen células bacterianas, de archaea, de insecto, fúngicas (por ejemplo, de levaduras), vegetales, y animales (por ejemplo, células de mamífero, tales como humanas). Las células ejemplares de uso incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium*, células SF9, células C129, células 293, *Neurospora*, y líneas celulares mieloides y linfoides de mamífero inmortalizadas. Las técnicas para la propagación de células de mamífero en cultivo son bien conocidas (véase, Jakoby y Pastan (eds), 1979, Cell Culture. Methods in Enzymology, volumen 58, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, N.Y.). Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero habitualmente usadas son células VERO y HeLa, células CHO, y las líneas celulares WI38, BHK, y COS, aunque pueden usarse líneas celulares, tales como células diseñadas para proporcionar mayor expresión, patrones de glucosilación deseables, u otras características.

La transformación de una célula hospedadora con ADN recombinante puede realizarse por técnicas convencionales que son bien conocidas para los especialistas en la técnica. Cuando el hospedador es procarionte tal como, aunque sin limitación, *E. coli*, pueden prepararse células competentes que son capaces de captar el ADN a partir de células recogidas después de la fase de crecimiento exponencial y posteriormente tratarse por el método de CaCl_2 usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, puede usarse MgCl_2 o RbCl . La transformación también puede realizarse después de formar un protoplasto de la célula hospedadora si se desea, o por electroporación.

Cuando el hospedador es un eucariota, pueden usarse métodos de transfección de ADN tales como coprecipitación con fosfato cálcico, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido incluido en liposomas, o vectores virales. Las células eucariotas también pueden co-transformarse con secuencias polinucleotídicas que codifican un polipéptido PAGE4 inmunogénico, y una segunda molécula de ADN foránea que codifica un fenotipo de selección, tal como el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple. Otro método es usar un vector viral eucariota, tal como el virus de simio 40 (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar de forma vectorial o transformar células eucariotas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, *Eukaryotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).

Métodos Terapéuticos y Composiciones Farmacéuticas

Un polipéptido PAGE4 inmunogénico como se describe en este documento, o un ácido nucleico que codifica el polipéptido PAGE4 inmunogénico, puede administrarse a un sujeto para generar una respuesta inmune.

En aplicaciones ejemplares, se administran composiciones a un paciente que padece una enfermedad, tal como un cáncer reproductor (por ejemplo, cáncer de próstata, cervical, testicular o uterino), en una cantidad suficiente para producir una respuesta inmune contra células que expresan PAGE4. La administración induce una respuesta inmune suficiente para ralentizar la proliferación de dichas células o inhibir su crecimiento, o para reducir un signo o un síntoma del tumor. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad, el estado general de la salud del paciente, y la robustez del sistema inmune del paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz del como es la que proporciona alivio subjetivo de uno o más síntomas o una mejora objetivamente identificable observada por el médico u otro observador cualificado.

Un polipéptido PAGE4 inmunogénico puede administrarse por cualquier medio conocido para los especialistas en la técnica (véase Banga, A., "Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins", en *Therapeutic Peptides and Proteins*, Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, PA, 1995) de forma local o sistémica, tal como por inyección intramuscular, subcutánea, o intravenosa, pero incluye se contempla la administración oral, nasal, o anal. En una realización, la administración es por inyección subcutánea o intramuscular. Para prolongar el tiempo durante el cual está disponible el péptido o la proteína para estimular una respuesta, el péptido o la proteína puede proporcionarse en forma de un implante, una inyección oleosa, o en forma de un sistema particulado. El sistema particulado puede ser una micropartícula, una microcápsula, una microesfera, una nanocápsula, o partícula similar (véase, por ejemplo, Banga, *supra*). Se ha demostrado que un vehículo particulado basado en un polímero sintético actúa como un adyuvante para potenciar la respuesta inmune, además de proporcionar una liberación controlada. También pueden usarse sales de aluminio como adyuvantes para producir una respuesta inmune.

En un ejemplo no limitante específico, se administra un polipéptido PAGE4 inmunogénico de un modo para dirigir la respuesta inmune a una respuesta celular (es decir, una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL)), en lugar de una respuesta humoral (de anticuerpos).

Opcionalmente, pueden usarse una o más citoquinas, tales como interleuquina (IL)-2, IL-6, IL-12, IL-15, RANTES, factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (IFN)- α o IFN- γ , uno o más factores de crecimiento, tales como GM-CSF o G-CSF, una o más moléculas co-estimuladoras, tales como ICAM-1, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, u otras moléculas relacionadas con B7; una o más moléculas tales como OX-40L o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas, como adyuvantes biológicos (véase, por ejemplo, Salgaller et al., 1998, J. Surg. Oncol. 68(2):122-38; Lotze et al., 2000, Cancer J Sci. Am. 6(Supl. 1):S61-6; Cao et al., 1998, Stem Cells 16(Supl. 1):251-60; Kuiper et al., 2000, Adv. Exp. Med. Biol. 465:381-90). Estas moléculas pueden administrarse de forma sistémica (o local) al hospedador. En varios ejemplos, se administran IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, B7-1, B7-2, OX-40L, 41 BBL e ICAM-1.

Se conocen varios medios para inducir respuestas celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han identificado lípidos como agentes capaces de ayudar a sensibilizar los CTL *in vivo* contra diversos antígenos. Por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.662.907, pueden unirse restos de ácido palmítico a los grupos alfa y epsilon amino de un resto de lisina y después unirse (por ejemplo, mediante uno o más restos de unión, tales como glicina, glicina-glicina, serina, serina-serina, o similares) a un péptido inmunogénico. El péptido lipídado

después puede inyectarse directamente en una forma micelar, incorporarse en un liposoma, o emulsionarse en un adyuvante. Como otro ejemplo, pueden usarse lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilserina para sensibilizar CTL específicos de tumor cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, Deres et al., *Nature* 342:561, 1989). Además, como la inducción de anticuerpos neutralizantes también puede

5 cebarse con la misma molécula conjugada con un péptido que presenta un epítipo apropiado, pueden combinarse dos composiciones para provocar respuestas tanto humorales como mediadas por células donde esto se considere deseable.

En otra realización más, para inducir una respuesta CTL contra un polipéptido PAGE4 inmunogénico, se añade un epítipo T auxiliar restringido a MHC de clase II al polipéptido PAGE4 inmunogénico para inducir que las

10 células T auxiliares secreten citoquinas en el microentorno para activar células precursoras de CTL. La técnica implica adicionalmente añadir moléculas lipídicas cortas para retener la construcción en el sitio de la eyección durante varios días para localizar el antígeno en el sitio de la inyección y potenciar su proximidad a las células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno "profesionales" durante un periodo de tiempo (véase Chesnut et al., "Design and Testing of Peptide-Based Cytotoxic T-Cell-Mediated Immunotherapeutics to Treat Infectious Diseases and Cancer", en Powell et al., eds., *Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach*, Plenum Press, Nueva York, 1995).

Por tanto se proporciona una composición farmacéutica que incluye un polipéptido PAGE4 inmunogénico. En una realización, el polipéptido PAGE4 inmunogénico se mezcla con un adyuvante que contiene dos o más de un

20 detergente estabilizador, un agente formador de micelas, y un aceite. Los detergentes estabilizadores, agentes formadores de micelas, y aceites adecuados se detallan en la patente de Estados Unidos N° 5.585.103; la patente de Estados Unidos N° 5.709.860; la patente de Estados Unidos N° 5.270.202; y la patente de Estados Unidos N° 5.695.770, todas las cuales se incorporan por referencia. Un detergente estabilizador es cualquier detergente que permite que los componentes de la emulsión permanezcan en forma de una emulsión estable. Dichos detergentes incluyen polisorbato, 80 (TWEEN) (Sorbitán-mono-9-octadecenoato-poli(oxi-1,2-etanodilo); fabricado por ICI Americas, Wilmington, DE), TWEEN 40™, TWEEN 20™, TWEEN 60™, ZWITTERGENT™ 3-12, TEEPOL HB7™, y SPAN 85™. Estos detergentes habitualmente se proporcionan en una cantidad de aproximadamente el 0,05 al 0,5%, tal como a aproximadamente el 0,2%. Un agente formador de micelas es un agente que es capaz de estabilizar la emulsión formada con los otros componentes de modo que se forma una estructura tipo micela. Dichos

25 agentes generalmente causan alguna irritación en el sitio de inyección para reclutar macrófagos para potenciar la respuesta celular. Ejemplos de dichos agentes incluyen tensioactivos poliméricos descritos por publicaciones de BASF Wyandotte, por ejemplo, Schmolka, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 54:110, 1977, y Hunter et al., *J. Immunol* 129:1244, 1981, PLURONIC™ L62LF, L101, y L64, PEG1000, y TETRONIC™ 1501, 150R1, 701, 901, 1301, y 130R1. Las estructuras químicas de dichos agentes son bien conocidas en la técnica. En una realización, el agente se elige para que tenga un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) entre 0 y 2, como se define por Hunter y Bennett, *J. Immun.* 133:3167, 1984. El agente puede proporcionarse en una cantidad eficaz, por ejemplo entre el 0,5 y el 10%, o en una cantidad entre el 1,25 y el 5%.

El aceite incluido en la composición se elige para promover la retención del antígeno en emulsión de aceite-en-agua, es decir, para proporcionar un vehículo para el antígeno deseado, y preferiblemente, tiene una temperatura de fusión de menos de 65°C de modo que se forme emulsión a temperatura ambiente (aproximadamente de 20°C a 25°C), o una vez que la temperatura de la emulsión se haya bajado a temperatura ambiente. Ejemplos de dichos

40 aceites incluyen escualeno, escualano, EICOSANE™, tetratetracontano, glicerol, y aceite de cacahuete u otros aceites vegetales. En un ejemplo no limitante específico, el aceite se proporciona en una cantidad entre el 1 y el 10%, o entre el 2,5 y el 5%. El aceite debe ser tanto biodegradable como biocompatible de modo que el cuerpo pueda descomponer el aceite con el tiempo, y de modo que no haya efectos adversos evidentes, tales como granulomas, después del uso del aceite.

En una realización, el adyuvante es una mezcla de detergentes estabilizadores, agente formador de micelas, y aceite disponible con el nombre PROVAX® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA). Un adyuvante también puede ser un ácido nucleico inmunoestimulador, tal como un ácido nucleico que incluye un motivo CpG, o un adyuvante biológico (véase anteriormente).

Pueden prepararse formulaciones parenterales de liberación controlada en forma de implantes, inyecciones oleosas, o en forma de sistemas particulados. Para una amplia visión global de sistemas de suministro de proteínas, véase Banga, *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, PA, 1995. Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas, y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico está dispersado en toda la partícula. Las partículas, microesferas, y microcápsulas más pequeñas de aproximadamente 1 µm generalmente se conocen como nanopartículas, nanoesferas, y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm de modo que solamente las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Las micropartículas típicamente sonde aproximadamente 100 µm de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular (véase Kreuter, *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, pág. 219-342, 1994; Tice y Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, pág. 315-339, 1992).

Pueden usarse polímeros para liberación controlada por iones. Se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en suministro controlado de fármacos en la técnica (Langer, *Accounts Chem. Res.* 26:537, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, polaxamer 407 existe en forma de un líquido viscoso aunque móvil a bajas temperaturas pero forma un gel semisólido a temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y suministro sostenido de interleuquina-2 recombinante y ureasa (Johnston et al., *Pharm. Res.* 9:425, 1992; y Pec, *J. Parent. Sci. Tech.* 44(2):58, 1990). Como alternativa, se ha usado hidroxapatita como microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., *Int. J. Pharm.* 112:215, 1994). En otro aspecto más, se usan liposomas para liberación controlada así como direccionamiento de

fármacos del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri et al., *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, PA, 1993). Se conocen numerosos sistemas adicionales para un suministro controlado de proteínas terapéuticas (por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.055.303; la patente de Estados Unidos Nº 5.188.837; la patente de Estados Unidos Nº 4.235.871; la patente de Estados Unidos Nº 4.501.728; la patente de Estados Unidos Nº 4.837.028; la patente de Estados Unidos Nº 4.957.735; y la patente de Estados Unidos Nº 5.019.369; la patente de Estados Unidos Nº 5.055.303; la patente de Estados Unidos Nº 5.514.670; la patente de Estados Unidos Nº 5.413.797; la patente de Estados Unidos Nº 5.268.164; la patente de Estados Unidos Nº 5.004.697; la patente de Estados Unidos Nº 4.902.505; la patente de Estados Unidos Nº 5.506.206; la patente de Estados Unidos Nº 5.271.961; la patente de Estados Unidos Nº 5.254.342; y la patente de Estados Unidos Nº 5.534.496).

En otra realización, una composición farmacéutica incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz del polinucleótido PAGE4 inmunogénico a un sujeto para generar una respuesta inmune. En un ejemplo no limitante específico, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del polinucleótido PAGE4 inmunogénico a un sujeto para tratar cáncer de próstata o cáncer de mama.

Opcionalmente, puede usarse una o más citoquinas, tales como IL-2, IL-6, IL-12, RANTES, GM-CSF, TNF- α , o IFN- γ , uno o más factores de crecimiento, tales como GM-CSF o G-CSF, una o más moléculas co-estimuladoras, tales como ICAM-1, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, u otras moléculas relacionadas con B7; una o más moléculas tales como OX-40L o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas, como adyuvantes biológicos (véase, por ejemplo, Salgaller et al., 1998, *J. Surg. Oncol.* 68(2):122-38; Lotze et al., 2000, *Cancer J Sci. Am.* 6(Supl. 1):S61-6; Cao et al., 1998, *Stem Cells* 16(Supl. 1):251-60; Kuiper et al., 2000, *Adv. Exp. Med. Biol.* 465:381-90). Estas moléculas pueden administrarse de forma sistémica al hospedador. Debe apreciarse que estas moléculas pueden co-administrarse mediante la inserción de un ácido nucleico que codifica las moléculas en un vector, por ejemplo, un vector pox recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.045.802). En diversas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el adyuvante biológico puede clonarse en el mismo vector que la secuencia codificante del polipéptido PAGE4 inmunogénico, o el ácido nucleico puede clonarse en uno o más vectores diferentes para su co-administración. Además, pueden co-administrarse factores inmunomoduladores no específicos tales como el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y levamisol.

Un enfoque para la administración de ácidos nucleicos es inmunización directa con ADN plasmídico, tal como con un plásmido de expresión en mamífero. Como se ha descrito anteriormente, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico puede colocarse bajo el control de un promotor para aumentar la expresión de la molécula.

La inmunización por construcciones de ácido nucleico es bien conocida en la técnica y se muestra, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 5.643.578 (que describe métodos para inmunizar vertebrados introduciendo ADN que codifica un antígeno deseado para provocar una respuesta mediada por células o humoral), y la patente de Estados Unidos Nº 5.593.972 y la patente de Estados Unidos Nº 5.817.637 (que describe la unión funcional de una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno a secuencias reguladoras que posibilitan la expresión). La patente de Estados Unidos Nº 5.880.103 describe varios métodos de suministro de ácidos nucleicos que codifican péptidos inmunogénicos u otros antígenos a un organismo. Los métodos incluyen suministro por liposomas de los ácidos nucleicos (o de los propios péptidos sintéticos), y construcciones inmunoestimuladoras, o ISCOMSTM, estructuras tipo jaula cargadas negativamente de 30-40 nm de tamaño formadas espontáneamente al mezclar colesterol y Quil ATM (saponina). Se ha generado inmunidad protectora en una diversidad de modelos experimentales de infección, incluyendo tumores inducidos por toxoplasmosis y virus de Epstein-Barr, usando ISCOMSTM como vehículo de suministro para antígenos (Mowat y Donachie, *Immunol Today* 12:383,1991). Se ha descubierto que dosis de antígeno tan bajas como 1 μ g encapsulado en ISCOMSTM producen respuestas CTL mediadas por clase I (Takahashi et al., *Nature* 344:873, 1990).

En otro enfoque para usar ácidos nucleicos para inmunización, también puede expresarse un polipéptido PAGE4 inmunogénico por hospedadores o vectores virales atenuados o vectores bacterianos. Pueden usarse vectores de virus vaccinia recombinante, virus adeno-asociado (AAV), herpesvirus, retrovirus, u otros vectores virales para expresar el péptido o proteína, provocando de este modo una respuesta CTL. Por ejemplo, se describen vectores vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización en la patente de Estados Unidos Nº 4.722.848. El BCG (bacilo de Calmette Guérin) proporciona otro vector para la expresión de péptidos (véase Stover, *Nature* 351:456-460, 1991).

Puede usarse un primer virus recombinante, tal como un poxvirus (por ejemplo, virus vaccinia) que codifica polipéptido PAGE4 inmunogénico junto con un segundo virus recombinante que ha incorporado en un genoma viral o parte infectable del mismo uno o más genes o secuencias de ADN que codifican B7-1, B7-2, o B7-1 y B7-2, donde la composición es capaz de co-infectar una célula hospedadora que provoca la co-expresión del polipéptido y los genes o secuencias de ADN que codifican B7-1, B7-2, o B7-1 y B7-2 (véase la patente de Estados Unidos Nº 6.893.869, y la patente de Estados Unidos Nº 6.045.908). La expresión de la familia de genes B7 ha demostrado ser un mecanismo importante de respuestas antitumorales tanto en ratones como en seres humanos.

Cuando se utiliza un vector viral, es deseable proporcionar al destinatario una dosificación de cada virus recombinante en la composición en el intervalo de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de placas/mg de mamífero, aunque puede administrarse una dosis menor o mayor. La composición de vectores virales recombinantes puede introducirse en un mamífero antes de cualquier evidencia de un tumor, tal como cáncer de próstata, uterino o testicular, o para mediar la regresión de la enfermedad en un mamífero afectado con el tumor. Los ejemplos de métodos para administrar la composición en mamíferos incluyen, aunque sin limitación, exposición de las células al virus recombinante *ex vivo*, o inyección de la composición en el tejido afectado o administración intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular del virus. Como alternativa el vector viral recombinante o la combinación de vectores virales recombinantes puede administrarse de forma local por

inyección directa a la lesión cancerosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Generalmente, la cantidad de vector viral recombinante, que lleva la secuencia de ácido nucleico de uno o más polipéptidos PAGE4 inmunogénicos a administrar se basa en el título de partículas virales. Un intervalo ejemplar del inmunógeno a administrar es de 10^9 a 10^{10} partículas virales por mamífero, tal como un ser humano.

5 En la realización en la que se usa una combinación de un primer vector viral recombinante que lleva una secuencia de ácido nucleico de uno o más polipéptidos PAGE4 inmunogénicos y un segundo vector viral recombinante que lleva la secuencia de ácido nucleico de una o más moléculas inmunoestimuladoras, el mamífero puede inmunizarse con diferentes proporciones del primer y el segundo vector viral recombinante. En una
10 realización, la proporción del primer vector al segundo vector es de aproximadamente 1:1, o de aproximadamente 1:3, o de aproximadamente 1:5. Las proporciones óptimas del primer vector al segundo vector pueden titularse fácilmente usando los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.893.869).

15 En una realización, se han construido virus recombinantes para expresar citoquinas (tales como TNF- α , IL-6, GM-CSF, e IL-2), y moléculas co-estimuladoras y accesorias (B7-1, B7-2) solas y en una diversidad de combinaciones. La producción simultánea de una molécula inmunoestimuladora y el polipéptido PAGE4 inmunogénico potencia la generación de efectores específicos. Sin limitarse por la teoría, dependiendo de las moléculas inmunoestimuladoras específicas, diferentes mecanismos pueden ser responsables de la inmunogenicidad potenciada: aumento de la señal auxiliar (IL-2), reclutamiento de APC profesionales (GM-CSF),
20 aumento en la frecuencia de CTL (IL-2), efecto sobre la vía de procesamiento de antígenos y expresión de MHC (IFN- γ y TNF- α) y similares. Por ejemplo, puede administrarse IL-2, IL-6, el interferón, factor de necrosis tumoral, o un ácido nucleico que codifique estas moléculas, junto con un polipéptido PAGE4 inmunogénico, o un ácido nucleico que codifique un polipéptido PAGE4. La co-expresión de un polipéptido PAGE4 inmunogénico junto con al menos una molécula inmunoestimuladora puede ser eficaz en un modelo animal para mostrar efectos anti-tumorales.

25 En una realización, se introduce un ácido nucleico que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico directamente en las células. Por ejemplo, el ácido nucleico puede cargarse en microesferas de oro por métodos convencionales e introducirse en la piel por un dispositivo tal como Bio-Rad's Helios™ Gene Gun. Los ácido nucleicos pueden estar "desnudos", compuestos por plásmidos bajo el control de un promotor fuerte. Típicamente, el ADN se inyecta en músculo, aunque también puede inyectarse directamente en otros sitios, incluyendo tejidos en la proximidad de las metástasis. Las dosificaciones para inyección son habitualmente de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a
30 aproximadamente 50 mg/kg, y típicamente son de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.589.466).

35 En un ejemplo no limitante específico, una composición farmacéutica para administración intravenosa incluiría de aproximadamente 0,1 μg a 10 mg de polipéptido PAGE4 inmunogénico por paciente por día. Pueden usarse dosificaciones de 0,1 hasta aproximadamente 100 mg por paciente por día, particularmente si el agente se administra en un sitio aislado y no en el sistema circulatorio o linfático, tal como en una cavidad corporal o en una luz de un órgano. Los métodos existentes para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los especialistas en la técnica y se describen en más detalle en publicaciones tales como *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1995.

40 Se administran administraciones sencillas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y frecuencia requeridas y toleradas por el sujeto. En una realización, la dosificación se administra una vez en forma de un bolo, pero en otra realización puede aplicarse periódicamente hasta que se consiga un resultado terapéutico. Generalmente, la dosis es suficiente para tratar o mejorar síntomas o signos de enfermedad sin producir toxicidad inaceptable al sujeto. Puede utilizarse administración sistémica o local.

45 En otro método, se pulsan o se co-incuban células presentadoras de antígeno (APC), tales como célula dendríticas, con péptidos que comprenden un polipéptido PAGE4 inmunogénico *in vitro*. En un ejemplo no limitante específico, las células presentadoras de antígeno pueden ser células autólogas. Después se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de las células presentadoras de antígeno a un sujeto.

50 El polipéptido PAGE4 inmunogénico puede suministrarse a las célula dendríticas o a precursores de células dendríticas mediante cualquier método en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, pulsación de células dendríticas directamente con antígeno, o utilización de una amplia diversidad de vehículos de suministro de antígenos tales como, por ejemplo, liposomas, u otros vectores conocidos para suministrar antígenos a células. En un ejemplo no limitante específico, una formulación antigénica incluye de aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 1.000 μg , o de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 μg de un polipéptido PAGE4 inmunogénico seleccionado. El polipéptido PAGE4 inmunogénico también puede administrarse con agentes que promueven la maduración de células dendríticas. Ejemplos no limitantes específicos de agentes de uso son interleuquina-4 (IL-4) y factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), o ligando flt-3 (flt-3L). La preparación también puede contener tampones, excipientes, y conservantes, entre otros ingredientes.

55 En una realización, se generan células presentadoras de antígeno maduras para presentar el polipéptido PAGE4 inmunogénico. Estas células dendríticas después se administran solas a un sujeto con un tumor que expresa PAGE4, tal como un cáncer de próstata o de mama. En otra realización, las células dendríticas maduras se administran junto con un agente quimioterapéutico.

60 Como alternativa, las APC se usan para sensibilizar células CD8, tales como linfocitos de infiltración en tumor (TIL) de tumores de próstata o mama o linfocitos de sangre periférica (PBL). Los TIL o PBL pueden ser del mismo sujeto (autólogos) que el que se tiene que tratar. Como alternativa, los TIL o PBL pueden ser heterólogos. Sin embargo, al menos deben ser de MHC de clase I restringido a los tipos HLA que el sujeto tiene. Después se
65 administra una cantidad eficaz de las células sensibilizadas al sujeto.

Pueden usarse células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como fuente de células respondedoras de precursores CTL. Las células presentadoras de antígeno apropiadas se incuban con péptido, después de lo cual después se incuban las células presentadoras de antígeno cargadas con péptido con la población de células respondedoras en condiciones de cultivo optimizadas. Puede determinarse la activación CTL positiva ensayando el cultivo para la presencia de CTL que eliminan células diana radiomarcadas, diana pulsadas con péptido específicas así como células diana que expresan formas procesadas de forma endógena del antígeno del que deriva el péptido, tal como PAGE4 (por ejemplo, SEC ID N° 1).

Las células pueden administrarse a un sujeto para inhibir el crecimiento de células de tumores que expresan PAGE4. En estas aplicaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de células presentadoras de antígeno activadas, o linfocitos activados, a un sujeto que padece una enfermedad, en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmune contra células que expresan PAGE4. La respuesta inmune resultante es suficiente para ralentizar la proliferación de dichas células o para inhibir su crecimiento, o para reducir un signo o síntoma del tumor.

En un método suplementario, se amplifica cualquiera de estas inmunoterapias administrando una citoquina, tal como la interleuquina (IL)-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF, interferones.

En un método adicional, se amplifica cualquiera de estas inmunoterapias administrando un agente quimioterapéutico adicional. En un ejemplo, esta administración es secuencial. Ejemplos de dichos agentes son agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, u hormonas y sus antagonistas. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostazas de nitrógeno (tales como mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, mostaza de uracilo o clorambucilo), sulfonatos de alquilo (tales como busulfán), nitrosoureas (tales como carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, o dacarbazina). Los ejemplos de antimetabolitos incluyen análogos de ácido fólico (tales como metotrexato), análogos de pirimidina (tales como 5-FU o citarabina), y análogos de purina, tales como mercaptopurina o tioguanina. Los ejemplos de productos naturales incluyen alcaloides de la vinca (tales como vinblastina, vincristina, o vindesina), epipodofilotoxinas (tales como etopósido o tenipósido), antibióticos (tales como dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina, o mitomicina C), y enzimas (tales como L-asparaginasa). Los ejemplos de agentes diversos incluyen complejos de coordinación de platino (tales como cis-diamina-dicloroplatino II también conocido como cisplatino), ureas sustituidas (tales como hidroxiourea), derivados de metilhidrazina (tales como procarbazona), y supresores adrenocorticales (tales como mitotano y aminoglutetimida). Los ejemplos de hormonas y antagonistas incluyen adrenocorticosteroides (tales como prednisona), progestinas (tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, y acetato de magesrol), estrógenos (tales como dietilestilbestrol y etinilestradiol), antiestrógenos (tales como tamoxifeno), y andrógenos (tales como propionato de testosterona y fluoximesterona). Los ejemplos de los fármacos quimioterapéuticos más habitualmente usados incluyen Adriamicina, Alkeran, Ara-C, BiCNU, Busulfán, CCNU, Carboplatino, Cisplatino, Citoxán, Daunorrubicina, DTIC, 5-FU, Fludarabina, Hydrea, Idarrubicina, Ifosfamida, Metotrexato, Mitramicina, Mitomicina, Mitoxantrona, Mostaza de Nitrógeno, Taxol (u otros taxanos, tales como docetaxel), Velban, Vincristina, VP-16, mientras que algunos fármacos más nuevos incluyen Gemcitabina (Gemzar), Herceptina, Irinotecán (Camptosar, CPT-11), Leustatina, Navelbina, Rituxán ST1-571, Taxotere, Topotecán (Hycamtin), Xeloda (Capecitabina), Zevelin y calcitriol. Los ejemplos no limitantes de inmunomoduladores que pueden usarse incluyen AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos; Genetics Institute), IL-2 (Cetus o Hoffman-LaRoche), inmunoglobulina humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg de New Orleans La.), SK&F 106528, y TNF (factor de necrosis tumoral; Genentech).

Reactivos para la Detección de Células que expresan CD8 (CD8+) Células que se Unen Específicamente a PAGE4

En este documento se proporcionan reactivos para la detección de células que expresan CD8 que se unen específicamente a PAGE4. Estos reactivos son complejos tetraméricos de MHC de clase I/polipéptido PAGE4 inmunogénico. Estos complejos tetraméricos incluyen un polipéptido PAGE4 inmunogénico que incluye como mucho diez, tal como nueve, aminoácidos consecutivos de la secuencia consenso:

MSARVRSRSRGRGDGX₁X₂APDVVAFVAPGESQQEPTDNDIEPGQEREGTPPIEERKX₃X₄GDCQEMDX₅EKTR
SERGDGSDVKEX₆X₇PPNPKHX₈KTKEAGDGQP (SEC ID N° 1, PAGE4 CONSENSO QUE MUESTRA
SUSTITUCIONES)

donde X₁ es Q o Y, X₂ es E o L, X₃ es V o Y, X₄ es E o L, X₅ es V o L, X₆ es K o Y, X₇ es T o L, y X₈ es A o V

y donde el polipéptido comprende uno de (a) los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1, (b) los aminoácidos 59 a 68 de la SEC ID N° 1, o (c) los aminoácidos 84 a 92 de la SEC ID N° 1. Anteriormente se han descrito ejemplos específicos del polipéptido PAGE4 inmunogénico que son de nueve aminoácidos de longitud.

Los complejos tetraméricos descritos en este documento no incluyen aminoácidos consecutivos adicionales de PAGE4 (SEC ID N° 1), de modo que el polipéptido no incluye la secuencia de aminoácidos de PAGE4 de longitud completa.

Los complejos tetraméricos de MHC de clase I/péptido pueden sintetizarse usando métodos bien conocidos en la técnica (Altmann et al., *Science* 274:94, 1996). En un ejemplo no limitante específico, puede sintetizarse la cadena pesada de HLA purificada y la β 2-microglobulina (β 2m) mediante un sistema de expresión procarionota. Un ejemplo no limitante específico de un sistema de expresión de uso es el sistema pET (R&D Systems, Minneapolis, MN). La cadena pesada se modifica por delección de la región transmembrana y la cola citosólica y la adición en el extremo COOH de una secuencia que contiene el sitio de biotilación enzimática por biotina proteína ligasa (Bir-A). La cadena pesada, la β 2m, y el péptido después se repliegan. El producto replegado puede aislarse por cualquier medio conocido en la técnica, y después biotinilarse por Bir-A. Después se produce un tetrámero poniendo en contacto el producto biotinilado con estreptavidina.

En una realización, la estreptavidina está marcada. Los marcadores adecuados incluyen, aunque sin limitación, enzimas, perlas magnéticas, perlas magnéticas coloidales, haptenos, fluorocromos, compuestos metálicos, compuestos radiactivos o fármacos. Las enzimas que pueden conjugarse con estreptavidina incluyen, aunque sin limitación, fosfatasa alcalina, peroxidasa, ureasa y β -galactosidasa. Los fluorocromos que pueden conjugarse con estreptavidina incluyen, aunque sin limitación, isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de tetrametilrodamina, ficoeritrina, alofococianinas y Rojo Texas. Para fluorocromos adicionales que pueden conjugarse con estreptavidina, véase Haugland, R. P., *Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1992-1994). Los compuestos metálicos que pueden conjugarse con estreptavidina incluyen, aunque sin limitación, ferritina, oro coloidal, y particularmente, perlas super-magnéticas coloidales. Los haptenos que pueden conjugarse con la estreptavidina incluyen, aunque sin limitación, biotina, digoxigenina, oxalona, y nitrofenol. Los compuestos radiactivos que pueden conjugarse con estreptavidina son conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, tecnecio 99m (^{99m}Tc), ^{125}I y aminoácidos que comprende cualquier radionúclido incluyendo, aunque sin limitación, ^{14}C , ^3H y ^{35}S . Generalmente, se utiliza estreptavidina marcada con un fluorocromo en los métodos descritos en este documento.

En una realización, se produce una suspensión de células que incluyen células T que reconocen específicamente PAGE4, y las células se hacen reaccionar con el tetrámero en suspensión. En una realización, estos reactivos se usan para marcar células, que después se analizan por separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Una máquina para FACS emplea una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de bajo ángulo y obtuso, y canales de impedancia, entre otros niveles más sofisticados de detección, para separar o clasificar células. Puede emplearse cualquier técnica FACS siempre que no sea perjudicial para la detección de las células deseadas. (Para métodos ejemplares de FACS véase la patente de Estados Unidos N° 5.061.620.)

La descripción se ilustra por los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Para desarrollar una inmunoterapia más eficaz para pacientes con cáncer, es importante encontrar nuevos antígenos específicos de tumor y es importante establecer nuevas estrategias de vacuna. Se identificó una nueva diana de cáncer de próstata potencial, PAGE4 (gen asociado a próstata 4), por análisis de bases de datos de marcas de secuencia en expresión (EST) y un enfoque genómico funcional (Brinkmann et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:10757-62; Brinkmann et al., Cancer Res 1999; 59:1445-8). El gen PAGE4 pertenece a la familia GAGE/PAGE, y se identificaron cinco genes PAGE homólogos (Brinkmann et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:10757-62; Brinkmann et al., Cancer Res 1999; 59:1445-8). El transcrito PAGE4 tiene una fase de lectura abierta predicha de 102 aminoácidos, y el producto proteico de Mr 16.000 de PAGE4 está localizado en el citoplasma de la célula. PAGE4 es un antígeno de testículo de cáncer (CT) ligado al cromosoma X expresado en testículo normal, próstata normal, útero normal, y altamente expresado en cáncer de próstata y uterino (Brinkmann et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:10757-62, lavarone et al., Mol Cancer Ther 2002; 1:329-35). También se informó de su expresión en placenta y las trompas de Falopio, y no se halló expresión en los otros tejidos normales (Brinkmann et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:10757-62).

Los antígenos de testículo de cáncer se expresan principalmente en las células germinales primitivas, las espermatogonias, en los testículos normales. La transformación maligna a menudo está asociada con la activación o depresión de genes CT silenciosos, y esto provoca la expresión de antígenos CT en una proporción variable de un amplio intervalo de tumores humanos. A causa de la barrera hemato-testicular (Bart et al., Lancet Oncol 2002; 3:357-363, Zendman et al., J Cell Physiol 2003; 194: 272-88) y como las células germinales no expresan las moléculas HLA clásicas (Fischer et al., Am J Reprod Immunol 1998; 40:172-176; Mintz et al., Crit Rev Oncog 2000; 11:77-95), la expresión de antígenos CT en testículo normal no conduce a activación de células T y por tanto hace de los antígenos CT candidatos atractivos para vacunas contra el cáncer (Moingeon, P. Cancer vaccines. Vaccine 2001; 19:1305-26). Se han identificado epítomos CTL de varios antígenos CT. Se ha informado de que antígenos testiculares de cáncer tales como NY-ESO-1, MAGE y SXX2 provocan respuestas inmunes humorales y celulares espontáneas en pacientes con cáncer (Jäger et al., J. Exp. Med 1998; 187:265-270; Ayyoub et al., J. Immunol 2002; 168:1717-1722; Nakada et al., Cancer Immunol 2003; 3:10). Se han realizado ensayos clínicos que abordan NY-ESO-1 y MAGE usando proteína recombinante, péptido, virus recombinante que codifica el antígeno, o células dendríticas pulsadas con péptido. Se han mostrado respuestas inmunes contra estos antígenos en pacientes vacunados (Jäger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000; 97:12198-12203; Atanackovic et al., J. Immunol 2004; 172:3289-3296; Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004; 101:10697-10702; Lonchay et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004; 101:14631-14638).

El estudio descrito en este documento informa de la identificación y caracterización de nuevos polipéptidos PAGE4 inmunogénicos, y la generación de un agonista potenciador de este epítipo. Líneas de células T generadas a partir de pacientes con cáncer de próstata usando el péptido agonista, mostraron elevados niveles de lisis de células tumorales que expresan PAGE4 y secreción potenciada de IFN- γ , granzima B, TNF- α , IL-2, y linfotactina.

La descripción se ilustra por los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Cultivos celulares: Las líneas celulares de carcinoma de próstata humano LNCaP (HLA-A2 positiva y PAGE4 positiva), 22Rv1 (HLA-A2 negativa y PAGE4 positiva), una línea celular de carcinoma de mama humano MCF-7 (HLA-A2 positiva y PAGE4 negativa) y una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano AsPC-1 (HLA-A2 negativa y PAGE4 negativa) se adquirieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Los cultivos estaban libres de micoplasma y se mantuvieron en medio completo [RPMI 1640 (Mediatech, Inc., Herndon,

VA) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomicina (Mediatech, Inc.). Las células PC3/PAGE4 [células PC3, una línea celular de carcinoma de próstata transflectada con un gen PAGE4 de longitud completa] (Iavarone et al., Mol Cancer Ther 2002; 1:329-35) se mantuvieron en el medio completo con 0,5 µg/ml de puromicina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células T2 transflectadas con el gen HLA-A2 (Hogan et al., J Exp Med 1988; 168:725-36) las proporcionó el Dr. Peter Cresswell (Yale University School of Medicine, New Haven, CT). Estas células estaban libres de micoplasma y se mantuvieron en medio completo de Dulbecco modificado por Iscove (Mediatech, Inc.).

Péptidos: La secuencia de aminoácidos de PAGE4 se exploró para coincidencias con los motivos consenso para péptidos de unión a HLA-A2. El algoritmo informático que se usó era de la sección de Bioinformática y Análisis Molecular de NIH (BIMAS), desarrollado por Parker et al. (Parker et al., J Immunol 1994; 152:163-75), que divide en categorías los péptidos de unión a MHC potenciales de acuerdo con la disociación predictiva a tiempo medio de los complejos péptido/MHC. Se eligió el alelo HLA-A2 porque es el alelo de clase I más habitualmente expresado. Se sintetizaron péptidos de nueve unidades y 10 unidades que se conformaba al motivo consenso respectivo. Se creó un panel de péptidos PAGE4 (Tabla 1), análogos con sustituciones de aminoácidos, y el péptido MUC-1 (Tsang et al., Clin Cancer Res 2004; 10:2139-49) por Biosynthesis Inc. (Lewisville, Texas) con una pureza >95%.

Citometría de flujo: Se realizó un análisis citométrico de flujo de dos colores sobre líneas de células T usando las siguientes combinaciones de anticuerpo: anti-CD56 humano-FITC/CD8-PE, CD8-FITC/CD45RA-PE, CD8-FITC/CD27-PE, y CD8-FITC/CD28 PE. Los anticuerpos se adquirieron todos de BD Biosciences (San José, CA). Se lavaron 5×10^5 células y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (PBS). Las células se incubaron con el anticuerpo apropiado durante 40 min. a 4°C y se lavaron. Las muestras se analizaron en un FACScan (BD Biosciences).

Tinción de tetrámero: El tetrámero PAGE4-P16-1/HLA-A*0201 marcado con ficoeritrina (PE) y el tetrámero de control VIH gag (SLYNTVATL)/HLA-A*0201 marcado con PE se obtuvieron de Beckman Coulter (Fullerton, CA). Se tiñeron 5×10^5 células T con 10 µl de tetrámero y anticuerpo anti-CD8 durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz, y se lavaron y fijaron en PBS con formaldehído al 0,5%. Se adquirieron 1×10^5 células en un citómetro de flujo FACSCALIBUR™ (BD Biosciences) y LSRII (BD Biosciences), y los datos se analizaron usando el software CELL QUEST™ (BD Biosciences) y el software FLOWJO™ (BD Biosciences), respectivamente.

Unión del péptido a HLA-A2: La unión de péptidos PAGE4 y los análogos de PAGE4 a moléculas HLA-A2 se evaluó por la regulación positiva de la expresión de HLA-A2 sobre células T2 como se demuestra por citometría de flujo (Nijman et al., Eur J Immunol 1993; 23:1215-9).

Cultivo de células dendríticas a partir de PBMC: Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un paciente con cáncer de próstata HLA-A2 a partir de sangre heparinizada. Las PBMC se separaron usando un gradiente de medio de separación de linfocitos (MP Biomedicals, Aurora, OH) siguiendo el procedimiento del fabricante. Las células dendríticas (DC) se prepararon usando una modificación del procedimiento descrito por Sallusto et al. (Sallusto et al., J Exp Med 1994; 179:1109-18).

Generación de líneas de células T: Se usaron PBMC de dos pacientes con cáncer de próstata (pacientes A y B) en un ensayo clínico descrito previamente utilizando una vacuna basada en PSA junto con radioterapia para cáncer de próstata localizado o avanzado de forma local (Gulley et al., Clin Cancer Res 2005; 11:3353-62) para la generación de líneas de células T. El paciente A era un hombre negro de 56 años de edad que se había diagnosticado hacía 1 año para empezar con el ensayo con un tumor T2cN1, Gleason 4+4, y un PSA de 63. En el diagnóstico, comenzó el tratamiento con un agonista de GnRH. Cuando empezó el ensayo clínico, tuvo elevación del PSA a pesar de la terapia hormonal. Completó 8 meses del tratamiento del estudio y posteriormente se descubrió que tenía enfermedad metastásica en el hígado. Murió de la enfermedad progresiva aproximadamente 8 meses después de completar el ensayo. El paciente B era un hombre blanco de 59 años de edad diagnosticado con un tumor T1c, Gleason 4+3, y un PSA de 8,4. Comentó el tratamiento del estudio 3 meses después del diagnóstico y está vivo sin evidencias de fallo bioquímico más de 2,5 años después de la conclusión de la terapia. Se usó la modificación del protocolo descrito por Tsang et al. (J Natl Cancer Inst 1995; 87:982-90) para generar CTL específicos de PAGE4. Se usaron DC autólogas irradiadas (3000 rad) como células presentadoras de antígeno (APC). Se estimularon células no adherentes autólogas en presencia de DC autólogas pulsadas con péptidos a una concentración de 12,5 µg/ml a una proporción efector-a-APC de 10:1. Los cultivos se mantuvieron durante 3 días iniciales en medio que contenía suero AB humano al 10%, y cuatro días adicionales en el mismo medio suplementado con 20 unidades/ml de IL-2 humana recombinante. Después de un periodo de cultivo de 7 días, denominado ciclo de estimulación *in vitro* (IVS), las células se volvieron a estimular como se ha descrito anteriormente durante un total de 3 IVS. Después del tercer ciclo IVS, se usaron células B transformadas con virus de Epstein-Barr (EBV) autólogo irradiadas (23.000 rad) como APC. Las células B transformadas con EBV autólogo se pulsaron con 12,5 µg/ml de péptidos a una proporción efector-a-APC de 1:3.

Ensayo citotóxico: Se usaron ensayos citotóxicos como se ha descrito previamente (Tsange et al., J Natl Cancer Inst 1995; 87:982-90). Se usó un ensayo de liberación de ^{111}In de 6 horas o 16 horas para determinar la eliminación mediada por células T. Las células diana se marcaron con óxido de ^{111}In (Amersham Health, Silver Spring, MD) durante 20 min. a temperatura ambiente, y se usaron a 3×10^3 células por pocillo, en placas de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos. Se midió el ^{111}In liberado por recuento gamma. La liberación espontánea se determinó incubando las células diana con medio solo, y la lisis completa incubando las células diana con Triton X-100 al 2,5%. Lisis específica (%) = [(liberación observada - liberación espontánea)/(liberación completa - liberación espontánea)] x 100.

Detección de citoquinas: Se exploraron los sobrenadantes de células T estimuladas durante 48 horas con células B transformadas con EBV autólogo pulsadas con péptido, en medio libre de IL-2 a diversas concentraciones de péptido, para la secreción de IFN-γ usando un kit ELISA (BioSource International, Camarillo, CA) y linfotactina usando un ensayo ELISA (36). La granzima B, el TNF-α y la IL-2 se determinaron usando un kit combinado de

citoquinas y quimioquinas (Meso Scale Discovery, Geithersburg, MD). Los resultados se expresaron en pg/ml.

Ensayo de movilización de CD107a: El ensayo de movilización de CD107a se realizó como se ha descrito previamente (Rubio et al., Nat Med 2003; 9:1377-82). En resumen, se incubaron $0,5 \times 10^6$ células efectoras/ml con células T2 pulsadas con 12,5 µg/ml de péptido o sin péptido a una proporción de 1:4 (E:T) durante 5 horas a 37°C en CO₂ al 5%. Se añadieron anticuerpos CD107a-FITC (BD Biosciences) para la detección de proteína-1 asociada a lisosomas (LAMP-1) a las células antes de la incubación. Después de 1 hora de incubación, se añadió 1 µl de monensina (Golgi-Stop, eBioscience, Inc) y se incubaron durante 4 h adicionales a 37°C en CO₂ al 5%. Las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpos CD8-PE (BD Biosciences) durante 40 min. a 4 °C. Las muestras después se fijaron y se analizó la expresión de CD107a sobre la superficie celular de células T CD8+ por citometría de flujo.

Infección de células diana con virus vaccinia recombinante: Se usó un vector vaccinia recombinante que codifica HLA-A2.1 para la infección de células 22Rv1. Este virus recombinante se construyó por la inserción del gen HLA-A2.1 en la región BamHI J del genoma de la cepa Wyeth del virus vaccinia como se ha descrito (Jenkins et al., AIDS Res Hum Retroviruses 1991; 7:991-998). El gen está bajo el control del promotor 40k de vaccinia (Gritz et al., J Virol 1990; 64:5948-5957). Las células diana a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio Opti-MEM (Invitrogen) con virus vaccinia a 10 pfu/célula (MOI=10) durante 1 hora a 37°C. Las células después se ajustaron a una concentración de 5×10^7 /ml en medio completo y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

Transfección de células diana con vector que contiene un ADNc de PAGE4 de longitud completa: Se transfectaron células MCF-7 (PAGE4 negativas, HLA-A2 positivas) con 1 µg de vector pcDNA3.1(+) que contenía un ADNc de PAGE4 de longitud completa (Chen et al., J Biol Chem 1998; 273:17618-17625) o vector de control pcDNA3.1(+) incubando 2×10^6 células/ml con vectores en medio Opti-MEM (Invitrogen) que contenía reactivo lipofectina (Invitrogen) durante 24 horas a 37°C, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las células infectadas se suspendieron en medio completo y se cultivaron durante 24 horas adicionales.

RT-PCR: Para el análisis de la expresión de PAGE4 en línea celulares tumorales, se realizó RT-PCR como se ha descrito previamente (Brinkman et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:10757-62) usando los siguientes cebadores: directo 5'-TTCTAGTTGCAGCGATGAG-3' (SEC ID N° 4) e inverso 5'-CATGCTTAGGATTAGGTGG-3' (SEC ID N° 5).

Análisis estadístico: El análisis estadístico de las diferencias entre las medias se hizo usando un ensayo *t* para muestras dependientes bilateral (software estadístico Stat View, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

Ejemplo 2

Afinidad de unión de péptidos PAGE4 y péptidos análogos a moléculas HLA-A2

La secuencia de aminoácidos primaria de PAGE4 humano se analizó para motivos consenso para nuevos péptidos de unión a HLA-A2. Se identificaron dos péptidos de 10 unidades (P16-25 denominado P16 y P59-68 denominado P59) y un péptido 9 unidades (P84-92 denominado P84) y se evaluaron (Tabla 1). El análisis de los restos aminoácidos primarios y secundarios del anclaje de unión a HLA-A2 en las posiciones 1, 2, 8 y 10 de los péptidos nativos reveló que la modificación de los aminoácidos en estas posiciones podría potenciar potencialmente la capacidad de unión del péptido a la molécula HLA-A2. Por esta razón, se sintetizaron cinco análogos diferentes de péptidos nativos y se investigaron para su capacidad de unión a células T2 HLA-A2-positivas junto con los péptidos P16, P59 y P84 nativos. Se usaron un péptido MUC-1 y un péptido CEA de unión a HLA-A3 (CAP-7) como control positivo y negativo, respectivamente (Tsang et al., J Natl Cancer Inst 1995; 87:982-90). Como se muestra en la Tabla 1, dos de los tres péptidos nativos (P16, P84) se unían a moléculas HLA-A2 en el ensayo T2.

Tabla 1. Unión de péptidos PAGE4 y péptidos análogos a moléculas HLA-A2

Péptidos	Denominación	Posición de aminoácidos		
		Véase la SEC ID N° 1	Secuencia peptídica	Unión T2 ^a
P16 (nativo)	P16	16-25	QEAPDVVAFV	309 (1,2)
P16 (17L)	P16-1	16-25	Q _L APDVVAFV	827 (3,2)
P16(16Y/17L)	P16-2	16-25	<u>Y</u> LAPDVVAFV	790 (3,0)
P59 (nativo)	P59	59-68	VEGDCQEMDL	246 (0,9)
P59 (60L)	P59-1	59-68	V _L GDCQEMDL	293 (1,1)
P59 (59Y/60L/68V)	P59-2	59-68	<u>Y</u> <u>L</u> GDCQEMD <u>Y</u>	384 (1,5)
P84 (nativo)	P84	84-92	KTPPNPKHA	270 (1,04)
P84 (84Y/85L/92V)	P84-1	84-92	<u>Y</u> <u>L</u> PPNPKH <u>Y</u>	546 (2,1)
Péptido MUC-1	(control positivo)		ALWGQDVTSV	710 (2,7)
Péptido CAP-7	(control negativo)		HLFGYSWYK	260

Los péptidos se usaron a una concentración de 25 µg/ml. Los aminoácidos se muestran por el código de una letra. Los aminoácidos de sustitución se indican en cursiva, negrita y subrayados. El péptido MUC-1 es un péptido de unión a HLA-A2 y CAP-7 es un péptido CEA de unión a HLA-A3.

^a Los resultados se expresan en intensidad de fluorescencia media (MFI). Los valores en paréntesis son el factor de aumento en comparación con el control negativo.

Los análogos de P16 se denominaron P16-1 y P16-2, y el análogo de P84 se denominó P84-1. Estos péptidos se unían a HLA-A2 a niveles mayores que sus péptidos nativos. Después se realizaron estudios para examinar la capacidad de estos péptidos de unirse a HLA-A2 a diversas concentraciones. Como se muestra en la Figura 1A, P16-1, P16-2 y P84-1 se unían a HLA-A2 a niveles mayores que los de los péptidos nativos, a todas las concentraciones. Estos resultados indicaron que los tres análogos con modificación en la posición de anclaje primaria y secundaria eran agonistas potenciales de los péptidos P16 y P84.

Después se emprendieron estudios para examinar la estabilidad del complejo péptido-MHC para los péptidos P16, P84, P16-1, P16-2 y P84-1. Cada péptido se incubó con células T2 durante una noche, los péptidos no unidos se eliminaron por lavado, y las células después se incubaron con Brefeldina A para bloquear el suministro de nuevas moléculas de clase a la superficie celular. Las células se analizaron para la presencia de complejos péptido-HLA-A2 en diversos momentos puntuales. Como se muestra en la Figura 1B, para todos los péptidos, más del 43,6% de los complejos permanecía durante el periodo de observación de 8 horas. Los complejos de P16-2 y P84-1 eran más estables que sus complejos con péptido nativo durante el mismo periodo de tiempo. Estos datos indicaron que tanto la unión a la molécula MHC como la estabilidad del complejo péptido-MHC eran mayores para los péptidos agonistas P16-1, P16-2 y P84-1 que para el péptido nativo P16 o P84.

Ejemplo 3

Inmunogenicidad de los péptidos nativo y agonista PAGE4

Se realizaron estudios para determinar si podrían generarse líneas de células T a partir de PBMC de pacientes con cáncer de próstata. Se usaron DC autólogas como APC. Se generaron cinco líneas de células T específicas de PAGE4 a partir de un paciente con cáncer de próstata (A) usando los péptidos P16, P16-1, P16-2, P84 y P84-1 (véase el Ejemplo 1). Las líneas de células T se denominaron T-A-P16, T-A-P16-1, T-A-P16-2, T-A-P84 y T-A-P84-1. La especificidad de las células T específicas de PAGE4 se analizó para su capacidad de liberar IFN-γ después de la estimulación con células B autólogas pulsadas con los péptidos correspondientes. Como se muestra en la Tabla 2, se observaron elevados niveles de producción de IFN-γ cuando las líneas de células T se estimulaban con el péptido específico.

Tabla 2. Producción de IFN-γ por líneas de células T generadas a partir de un paciente con cáncer de próstata estimulado con P16, P84 y sus péptidos agonistas

Línea de células T	Producción de IFN-γ (pg/ml)	
	Péptido correspondiente	Ninguno
T-A-P16	302,0	<15,6
T-A-P16-1	611,6	<15,6
T-A-P16-2	497,0	<15,6
T-A-P84	97,5	<15,6
T-A-P84-1	248,5	<15,6

Se usaron células de cinco líneas de células T específicas de PAGE4 establecidas a partir de un paciente con cáncer de próstata (paciente A) como células efectoras en estimulación *in vitro* (IVS-4). Estas líneas de células T se establecieron por estimulación con células B autólogas pulsadas con P16 (T-A-P16), células B autólogas pulsadas con P16-1 (T-A-P16-1), células B autólogas pulsadas con P16-2 (T-A-P16-2), células B autólogas pulsadas con P84 (T-A-P84), y células B autólogas pulsadas con P84-1 (T-A-P84-1). Para la producción de IFN-γ, las líneas de células T se estimularon con el péptido correspondiente a una concentración de 12,5 µg/ml y una proporción efector-a-APC de 1:3. Se recogieron sobrenadantes de cultivo de veinticuatro horas y se exploraron para la secreción de IFN-γ.

Los mayores niveles de producción de IFN-γ se observaron para la línea de células T T-A-P16-1 y los niveles más bajos de producción de IFN-γ se observaron para la línea de células T T-A-P84.

Después se emprendieron estudios para examinar la capacidad de los péptidos P16, P16-1, P16-2 de activar las células T-A-P16, que se generaron con el péptido nativo P16. Como se observa en la Figura 2, los mayores niveles de producción de IFN-γ, linfotactina, granzima B, TNF-α e IL-2 se observaron cuando las células T-A-P16 se estimulaban con péptido P16-1 en comparación con el péptido nativo P16 o P16-2. Por tanto se eligió el agonista P16-1 para estudio adicional.

Ejemplo 4

El péptido agonista P16-1 activaba células T para lisar dianas pulsadas con péptido

5 Para examinar la capacidad de los péptidos P16 y P16-1 de activar las células T específicas de PAGE4, se analizaron posteriormente células T-A-P16 para la capacidad de lisar dianas pulsadas con péptido. Como se muestra en la Tabla 3, la lisis de células T2 pulsadas con el péptido P16-1 era mayor que la lisis de células T2 pulsadas con el péptido P16, a dos proporciones E:célula T diferentes.

Tabla 3. Capacidad de líneas de células T específicas de PAGE4 (T-A-P16, T-B-P16-1) de lisar dianas pulsadas con péptido

Diana	% de lisis (\pm SD)*			
	T-A-P16		T-B-P16-1	
	30:1	15:1	30:1	15:1
T2	5,1 (1,1)	6,4 (0,2)	7,6 (0,1)	6,6 (0,9)
T2 + P16	12,7 (1,7)	9,1 (0,9)	23,5 (0,6)	22,7 (0,8)
T2 + P16-1	20,4 (1,9)	16,7 (0,9)	34,7 (0,04)	25,8 (0,6)

* Se realizó un ensayo de liberación de ^{111}In de 16 horas. Los resultados se expresan en porcentaje de lisis específica a una proporción efector-a-diana de 30:1 y 15:1. Se incubaron células T2 marcadas con o sin péptido (12,5 $\mu\text{g/ml}$) en medio libre de suero durante 2 horas a 37°C antes de su adición en el ensayo. Las células efectoras se usaron a IVS4.

10 Como se determinó por análisis citométrico de flujo, la línea celular T-A-P16-1 era un 91,0% CD8 positiva, un 20,3% CD45RA positiva, un 11,2% CD28 positiva, y un 14,9% CD27 positiva, un 24,9% CCR7 positiva.

15 Para caracterizar adicionalmente el péptido P16-1, se estableció una línea de células T adicional a partir de otro paciente de cáncer de próstata HLA-A2 positivo (paciente B) usando DC autólogas pulsadas con péptido agonista P16-1. Esta línea de células T se denominó T-B-P16-1. Como se determina por análisis citométrico de flujo, la línea celular T-B-P16-1 es un 98,9% CD8 positiva, <1% CD56 positiva, un 11,5% CD45RA positiva, y un 0,1% CD27 positiva. Como se muestra en la Tabla 3, las células T-B-P16-1 también lisaban células T2 pulsadas con el péptido P16-1 a un grado mayor que las pulsadas con el péptido P16, a dos proporciones E:célula T diferentes. Este resultado también apoyaba que la modificación del péptido nativo en el agonista no afectaba de forma adversa a la capacidad de los CTL inducidos por P16-1 de reconocer el epítipo nativo.

20 Para determinar la desgranulación de CTL que es un proceso necesario para la eliminación mediada por perforina-granzima por células T CD8+ activadas, se examinó la movilización de CD107a a la superficie de células T CD8+ después de la activación con péptidos P16 o P16-1 además de ensayos de CTL. Se incubaron células T-B-P16-1 con células T2 pulsadas con péptido nativo P16 o agonista P16-1 durante 5 horas en presencia de monensina y se analizaron para la movilización de CD107a por análisis citométrico de flujo (Figura 3). Una mayor cantidad de células T CD8+ expresaba CD107a superficial cuando las células T-B-P16-1 se estimulaban con las células T2 pulsadas con péptido P16-1 en comparación con las células T2 pulsadas con péptido nativo P16. Por tanto, estos resultados mostraron una correlación entre la expresión de CD107a y la actividad citotóxica por la línea de células T específica de PAGE4 (Figura 3).

Ejemplo 5

CTL CD8+ generados con péptido agonista P16-1 eliminan células tumorales que expresan PAGE4

30 Entonces se realizaron estudios para determinar si las líneas de células T específicas de PAGE4 podrían lisar células tumorales que expresan de forma endógena PAGE4 nativo. La expresión de HLA-A2 y PAGE4 en líneas celulares tumorales se analizó por citometría de flujo y RT-PCR, respectivamente (Tabla 4). Como se muestra en la Figura 4, las células T-A-P16 eran capaces de lisar células de cáncer de próstata humano LNCaP que expresan PAGE4 nativo y son HLA-A2 positivas. Además, las células T-A-P16-1 establecidas usando el péptido P16-1 lisaban células LNCaP a un mayor grado que las células T-A-P16 a dos proporciones E:célula T diferentes.

35 Tabla 4. Las células tumorales procesan de forma endógena PAGE4 para presentar el péptido PAGE4 en el contexto de HLA-A2 para la lisis mediada por células T.

Experimento 1:

Capacidad de la línea de células T específica de PAGE4 de lisar células tumorales humanas que expresan PAGE4

Diana	Tipo de cáncer	HLA-A2 ^a	PAGE4 ^b	% lisis (\pm SD) ^c
LNCaP	células de cáncer de próstata	46,7 (19)	+	20,4 (0,3) ^d

PC3/PAGE4	células de cáncer de próstata	negativo	+	0,0 (0,0)
22Rv1	células de cáncer de próstata	negativo	+	0,0 (1,5)
MCF-7	células de cáncer de mama	97,7 (117)	-	0,6 (1,0)
AsPC-1	células cáncer pancreático	negativo	-	0,0 (0,3)

Experimento 2:

Demostración de la implicación de HLA-A2

Diana	Infección	HLA-A2 ^a	PAGE4 ^b	% lisis (±SD) ^c
22Rv1	sin infección	negativo	+	0,8 (0,3)
	V-WT	negativo	+	0,0 (1,0)
	rV-HLA-A2	61,4(23)	+	31,2 (1,9) ^e
MCF-7	sin infección	97,8 (43)	-	0,6 (1,0)
	plásmido de control	95,5 (35)	-	2,7 (0,9)
	pPAGE4	97,0 (37)	+	43,8 (2,6) ^e

^a La expresión de HLA-A2 se ensayó por citometría de flujo. Los resultados se expresan en porcentaje de células positivas (intensidad de fluorescencia media).

^b La expresión del ARNm de PAGE4 se detectó por PCR de transcripción inversa.

^c Se realizó un ensayo de liberación de ¹¹¹In de 6 horas usando células T-B-P16-1. Los resultados se expresan en porcentaje de lisis específica a una proporción efector-a-diana de 30:1 (*Experimento 1*) o 50:1 (*Experimento 7*)

^d Significancia estadística cuando se compara la lisis de células LNCaP frente a células PC3/PAGE4, células 22Rv1, células MCF-7 o células AsPC-1 ($P < 0,01$, ensayo *t* bilateral).

^e Lisis estadísticamente significativa en comparación con células 22Rv1 infectadas y no infectadas con V-WT así como células MCF-7 infectadas y no infectadas con plásmido de control ($P < 0,01$, ensayo *t* bilateral).

Como solamente el 46,7% de las células expresaban moléculas HLA-A2 sobre la superficie celular, el porcentaje real de lisis específica para células LNCaP que expresan HLA-A2 podría normalizarse al 43,6%. El análisis del fenotipo de las líneas celulares T-A-P16 y T-A-P16-1 demostró que las células T-A-P16 eran un 97,3% CD8 positivas, un 12,3% CD45RA positivas, un 0,4% CD27 positivas, y un 21,6% CCR7 positivas, y las células T-A-P16-1 eran un 99,5% CD8 positivas, un 13,5% CD45RA positivas, un 0,9% CD27 positivas, y un 24,9% CCR7 positivas. Para examinar la frecuencia de células T CD8+ específicas de PAGE4 en estas líneas celulares, las células T se tiñeron con tetrámero PAGE4-P16-1/HLA-A*0201 y anticuerpos anti-CD8. Los resultados mostraron que el 7,6% de las células T-A-P16 y el 17,1% de las células T-A-P16-1 eran células T CD8+ tetrámero-positivas. Estos resultados indicaron que el péptido agonista P16-1 era más eficaz en la generación de células T CD8+ con una elevada frecuencia de péptido PAGE4 que el péptido nativo P16. Los bajos niveles de lisis por las células T-A-P16 pueden explicarse por el hecho de que las células T-A-P16-1 tenían una alta cantidad de células T específicas de PAGE4 mediadas por el ensayo de unión de tetrámero.

Ejemplo 6

Las células tumorales procesan de forma endógena PAGE4 para presentar el péptido PAGE4 en el contexto de HLA-A2

Como se muestra en la Tabla 4, las células T-B-P16-1 eran solamente capaces de lisar las células LNCaP (PAGE4 positivas, HLA-A2 positivas), pero no mostraron lisis contra las células de cáncer de próstata humano PC3 HLA-A2-negativas transfectadas con el gen PAGE4 humano (PC3/PAGE4), las células de cáncer de próstata humano 22Rv1 (PAGE4 positivas, HLA-A2 negativas), las células de cáncer de mama humano MCF-7 (PAGE4 negativas, HLA-A2 positivas), las células de cáncer pancreático humano AsPC-1 (PAGE4 negativas, HLA-A2 negativas).

Para confirmar la hipótesis de que los tumores humanos procesaban de forma endógena la molécula PAGE4 completa de un modo para que se uniera a moléculas HLA-A2 para su presentación en la superficie celular, se transfectaron células 22Rv1 (PAGE4 positivas, HLA-A2 negativas) con rV-HLA-A2 recombinante y se usaron como células diana en un ensayo citotóxico de células T. Como se muestra en la Tabla 4, las células 22Rv1 expresaban HLA-A2 después de su infección con rV-HLA-A2. Las células 22Rv1 eran susceptibles a la lisis con células T-B-P16-1 cuando se transfectaban con rV-HLA-A2 pero no con V-WT de control. Además, las células MCF-7 (PAGE4 negativas, HLA-A2 positivas) se transfectaron con el gen PAGE4 humano y se usaron como células diana en un ensayo citotóxico de células T. Como se muestra en la Tabla 4, las células MCF-7 eran susceptibles a la lisis con células T-B-P16-1 cuando se transfectaban con pPAGE4 pero no con plásmido de control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los tumores humanos procesaban de forma endógena la molécula PAGE4 completa y la

naturaleza restringida a HLA-A2 de la lisis específica de PAGE4 de las células T-B-P16-1.

Para confirmar la especificidad y la restricción a HLA-A2 de la citólisis CTL, se usaron células LNCaP como diana en un ensayo de inhibición de diana fría. Como se muestra en la Figura 5A, la adición de células T2 no marcadas pulsadas con péptido agonista P16-1 disminuía en un 79,6% la actividad CTL de las células T-A-P16-1 contra células LNCaP marcadas. Además, para determinar si la lisis estaba restringida a HLA-A2, se realizaron experimentos de bloqueo de anticuerpos. Se demostró que la actividad CTL de las células T-A-P16-1 contra células LNCaP estaba restringida a HLA-A2 como se indica por la inhibición de la lisis con anticuerpo anti-HLA-A2 pero no con anticuerpo de control (Figura 5B). Estos resultados mostraron que las células T específicas de PAGE4 generadas usando el agonista P16-1 podían lisar células tumorales que expresan de forma endógena PAGE4 nativo de un modo específico de antígeno y restringido a HLA-A2.

Ejemplo 7

Identificación de células T específicas de P16-1 en individuos sanos y pacientes con cáncer de próstata

Para evaluar el potencial del epítipo P16-1 de PAGE4 para inmunoterapia mediada por vacuna, se investigó si podían identificarse células T específicas de P16-1 a partir de PBMC de individuos sanos y pacientes con cáncer de próstata. Para comparar la frecuencia y fenotipo de las células T específicas de P16-1 en individuos sanos y pacientes con cáncer de próstata, se usó el tetrámero PAGE4-P16-1/HLA-A*0201 marcado con PE para identificar las células T específicas de P16-1. Las células T se cultivaron *in vitro* durante una IVS (Fig. 6A) o dos IVS (Fig. 6B) antes de la tinción con tetrámero. La frecuencia de células positivas al tetrámero PAGE4-P16-1/HLA-A*0201 en células T CD8+ era mayor en pacientes con cáncer de próstata en comparación con individuos sanos en cultivos tanto IVS-1 como IVS-2.

Estos resultados sugieren que el péptido agonista P16-1 de PAGE4 puede usarse solo o en combinación con otros péptidos de antígenos asociados a cáncer de próstata en inmunoensayos sensibles para controlar las respuestas inmunes de pacientes en ensayos clínicos de vacuna contra el cáncer de próstata.

El PAGE4 es un antígeno CT que se expresa en cánceres de próstata dependientes de hormonas y refractarios a hormonas así como en cánceres uterinos. También se halló en líneas celulares de cáncer de próstata tales como células LNCaP (Prikler et al., *Aktuel Urol* 2004; 35:326-330). Este estudio identifica epítipos CTL restringidos a HLA-A2 derivados de PAGE4 y la modificación de restos de anclaje primarios de los nuevos péptidos PAGE4, que han demostrado potenciar la afinidad de unión por la molécula HLA-A2. Se sintetizaron y analizaron cuatro análogos.

Los resultados de este estudio demuestran la síntesis potenciada de IFN- γ , TNF- α , IL-2, granzima B y la quimioquina linfotactina como consecuencia de la estimulación de células T específicas de PAGE4 con el péptido agonista P16-1. Estudios preclínicos y clínicos han indicado que la linfotactina puede ser una quimioquina importante para atraer células efectoras y por tanto para potenciar las respuestas inmunes.

La desgranulación es un proceso necesario de la eliminación mediada por perforina-granzima, y es una etapa crítica necesaria para la función lítica inmediata mediada por células T CD8+ específicas de antígeno respondedoras. Los gránulos líticos son lisosomas secretores unidos a membrana que contienen un núcleo denso compuesto por diversas proteínas, incluyendo la perforina y granzimas. Es posible estimar directamente la desgranulación en células T CD8+ específicas de antígeno respondedoras primarias midiendo la exposición cumulativa de las proteínas de membrana granulares (CD107a y b) sobre la superficie celular (Rubio et al., *Nat Med* 2003; 9:1377-82). En el presente estudio, células T CD8+ específicas de PAGE4 estimuladas con péptidos PAGE4 aumentaban la movilización superficial de CD107a, y demostraron la correlación entre la movilización de CD107a a la superficie celular y la actividad citotóxica. De forma más importante, las células T estimuladas por el péptido agonista P16-1 mostraron mayores niveles de CD107a sobre la superficie celular en comparación con células T estimuladas con el péptido nativo P16.

Se demostró que líneas de células T derivadas de pacientes con cáncer de próstata usando los epítipos PAGE4 nativo o agonista lisaban líneas celulares de cáncer de próstata PAGE4 positivas y HLA-A2 positivas, así como células MCF-7 transfectadas con el gen PAGE4 de un modo restringido al MHC. Los estudios por tanto indican que el péptido agonista PAGE4 podría usarse (solo o en combinación con otros péptidos de antígenos asociados a cáncer de próstata) para producir inmunoensayos sensibles para controlar las respuestas inmunes de pacientes implicados en ensayos clínicos de vacuna contra el cáncer de próstata.

Los estudios preclínicos han demostrado que el uso de vectores recombinantes de poxvirus que codifican los transgenes para CEA y una tríada de moléculas co-estimuladoras de células T (B7-1, ICAM-1 y LFA-3) (TRICOM) provoca una mayor activación de células T CD4 y CD8 específicas de antígeno y actividad antitumoral (Hodge et al., *Cancer Res* 1999; 59:5800-7; Hodge et al., *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1228-1239; Hodge JW, et al., *Vaccine* 2001; 19:3552-67; Zhu et al., *Cancer Res* 2001; 61:3725-34; Tsang et al., *Clin Cancer Res* 2005; 11:1597-1607). Están en progreso varios ensayos clínicos que implican vectores recombinantes de poxvirus que codifican los transgenes para PSA, MUC-1 o CEA que contienen los epítipos agonistas y TRICOM en pacientes con cáncer (Gulley et al., *Abstr Am Soc Clin Oncol. Prostate Cancer Symposium* 2005; 1:Abs 256).

Estos epítipos PAGE4, tales como P16 y P16-1 son los primeros epítipos CTL a identificar para PAGE4. El polipéptido PAGE4 descrito en este documento podría usarse como una vacuna peptídica como adyuvante o en terapia de DC pulsadas con péptido autólogo para el cáncer de próstata. Puede usarse el transgén PAGE4 con epítipo agonista como parte de los vectores virales recombinantes para el tratamiento del cáncer de próstata.

Ejemplo 8

Administración de PAGE4 junto con una molécula co-estimuladora

El virus vaccinia parental es la cepa New York City Board of Health y se obtuvo por Wyeth del New York City Board of Health y se pasó en terneros para crear la semilla de vacuna Smallpox. Los Flow Laboratories recibieron un vial liofilizado de la semilla de vacuna Smallpox, Lote 3197, Pase 28 de los Drs. Chanock y Moss (National Institutes of Health). Este virus de semilla se trató con éter y se purificó en placa tres veces.

Para la generación de rV-TRICOM(mu1), se construyó un vector plasmídico, denominado pT5032 para dirigir la inserción de las secuencias foráneas en el gen M2L (30K), que está localizado en la región Hind III M del genoma de vaccinia. El gen LFA-3 murino está bajo el control transcripcional del promotor 30K de vaccinia (M2L), el gen ICAM-1 murino está bajo el control del promotor 13 de vaccinia, y el gen B7-1 murino está bajo el control del promotor temprano/tardío sintético (sE/L). Estas secuencias foráneas están flanqueadas por secuencias de ADN de la región Hind III M del genoma de vaccinia (véase la FIG. 1 de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2004/0019195). Estas secuencias flanqueantes incluyen el gen de rango de hospedador K1L de vaccinia.

Se usó un derivado de la cepa Wyeth de vaccinia como el virus parental en la construcción del virus vaccinia recombinante. Este virus parental, denominado vTBC33, carece del gen K1L funcional y por tanto no puede replicarse de forma eficaz en células RK13 de riñón de conejo. La generación de virus vaccinia recombinante se consiguió mediante recombinación homóloga entre las secuencias de vaccinia en el genoma de vaccinia vTBC33 y las secuencias correspondientes en pT5032 en células RK13 infectadas con vaccinia transfectadas con pT5032. El virus recombinante, denominado vT171, se seleccionó para su cultivo en células RK13 (n° de acceso a la ATCC CCL 37). Se picaron placas de la monocapa celular y su descendencia se propagó adicionalmente. Dos rondas de aislamiento de placas y resiembra en células RK13 provocaron la purificación del recombinante deseado.

Para la generación de rV-PAGE4/TRICOM(mu), se construyó un vector plasmídico, denominado pTXXXX, para dirigir la inserción de las secuencias foráneas en el gen M2L (30K), que está localizado en la región Hind III M del genoma de vaccinia. El ácido nucleico que codifica un polipéptido PAGE4 inmunogénico está bajo el control del promotor 40K, el gen LFA-3 murino está bajo el control del promotor 30K, el gen ICAM-1 murino está bajo el control del promotor 13, y el gen B7-1 murino está bajo el control del promotor sE/L.

Estas secuencias foráneas están flanqueadas por secuencias de ADN de la región Hind III M del genoma de vaccinia, incluyendo el gen de rango de hospedador K1L de vaccinia. El vTBC33, descrito anteriormente, se usa como virus parental en la construcción del virus vaccinia recombinante. La generación de virus vaccinia recombinante se consigue mediante recombinación homóloga entre las secuencias de vaccinia en el genoma de vaccinia vTBC33 y las secuencias correspondientes en pTXXX en células RK13 infectadas por vaccinia transfectadas con pT5031. El virus recombinante, denominado vTXXX, se seleccionó por cultivo en células RK13 como se ha descrito anteriormente. Se picaron placas de la monocapa celular y su descendencia se propagó adicionalmente. Dos rondas de aislamiento de placas y resiembra en células RK13 provocaron la purificación del recombinante deseado.

Se han descrito los virus vaccinia recombinantes individuales que contienen o el gen que codifica la molécula co-estimuladora B7-1 murina (denominado rV-B7-1) o el gen que codifica la molécula de adhesión intracelular-1 murina (denominado rV-ICAM-1). El virus vaccinia recombinante que contiene el gen para CD48 murino [denominado rV-LFA-3; el CD48 murino es el homólogo de LFA-3 humano (CD58)] se construyó de una forma similar a rV-B7-1 y rV-ICAM-1, y se ha descrito. En cada uno de estos virus vaccinia recombinantes individuales, el gen que codifica la molécula co-estimuladora se puso bajo el control del promotor 40K temprano/tardío del virus vaccinia, y el transgén se insertó en la región Hind III M del genoma de la cepa Wyeth del virus vaccinia.

Se construyeron fowlpoxvirus recombinantes por la inserción de secuencias foráneas en la región BamHI J del genoma de la cepa POXVAC-TC (Schering Corporation) de fowlpoxvirus como se ha descrito. En virus recombinantes que contienen un único gen foráneo, el gen está bajo el control del promotor 40K de vaccinia. El rV-B7-1/ICAM-1 es un virus vaccinia recombinante que contiene el gen B7-1 murino bajo el control del promotor temprano/tardío sintético (sE/L) y el gen ICAM-1 murino bajo el control del promotor 40K. El rV-B7-1/ICAM-1/LFA-3 es un virus vaccinia recombinante que contiene el gen LFA-3 murino bajo el control del promotor 30K de vaccinia (M2L), el gen ICAM-1 murino bajo el control del promotor D de vaccinia, y el gen B7-1 murino bajo el control del promotor temprano/tardío sintético (sE/L).

El rF-PAGE4/B7-1/ICAM-1/LFA-3 es un fowlpoxvirus recombinante que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunoestimulador PAGE4, tal como P16-1, bajo el control del promotor 40K, el gen B7-1 murino bajo el control del promotor sE/L; el gen LFA-3 murino bajo el control del promotor 13, y el gen ICAM-1 murino bajo el control del promotor 7.5K de vaccinia (véase la publicación de patente de Estados Unidos N° 2004/0019195).

Para confirmar que cada uno de los vectores recombinantes podría expresar el o los transgenes apropiados, se infecta la línea celular de adenocarcinoma murino MC38 con la construcción de vaccinia recombinante, y se demuestra la expresión en la superficie celular del transgén o transgenes por citometría de flujo. Las células no infectadas y las células infectadas con vaccinia de tipo silvestre no logran expresar ninguna de las tres moléculas co-estimuladoras.

Será evidente que los detalles precisos de los métodos o composiciones descritos pueden variarse o modificarse sin alejarse de la invención. Se reivindican todas estas modificaciones y variaciones que están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> El Gobierno de los Estados Unidos de América representado por el Secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos
Schlom, Jeffrey
- 5 Tsang, Kwong-Yok
Pastan, Xra H
- <120> PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS Y MÉTODOS DE USO
- <130> 4239-73266-02
- <150> US 60/776.506
- 10 <151> 24-02-2006
<160> 5
<170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 102
- 15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
- 20 <223> Xaa puede ser Gln o Tyr
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Xaa puede ser Glu o Leu
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (59)..(59)
<223> Xaa puede ser Val o Tyr
<220>
- 30 <221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> Xaa puede ser Glu o Leu
<220>
<221> MISC_FEATURE
- 35 <222> (68)..(68)
<223> Xaa puede ser Val o Leu
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84)..(84)
- 40 <223> Xaa puede ser Lys o Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (85)..(85)

<223> Xaa puede ser Thr o Leu

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (92)..(92)

<223> Xaa puede ser Ala o Val

<400> 1

Met Ser Ala Arg Val Arg Ser Arg Ser Arg Gly Arg Gly Asp Gly Xaa
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Asp Val Val Ala Phe Val Ala Pro Gly Glu Ser Gln Gln
20 25 30

Glu Glu Pro Pro Thr Asp Asn Gln Asp Ile Glu Pro Gly Gln Glu Arg
35 40 45

Glu Gly Thr Pro Pro Ile Glu Glu Arg Lys Xaa Xaa Gly Asp Cys Gln
50 55 60

Glu Met Asp Xaa Glu Lys Thr Arg Ser Glu Arg Gly Asp Gly Ser Asp
65 70 75 80

Val Lys Glu Xaa Xaa Pro Pro Asn Pro Lys His Xaa Lys Thr Lys Glu
85 90 95

Ala Gly Asp Gly Gln Pro
100

10

<210> 2

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 2

ES 2 356 574 T3

Met Ser Ala Arg Val Arg Ser Arg Ser Arg Gly Arg Gly Asp Gly Gln
 1 5 10 15
 Glu Ala Pro Asp Val Val Ala Phe Val Ala Pro Gly Glu Ser Gln Gln
 20 25 30
 Glu Glu Pro Pro Thr Asp Asn Gln Asp Ile Glu Pro Gly Gln Glu Arg
 35 40 45
 Glu Gly Thr Pro Pro Ile Glu Glu Arg Lys Val Glu Gly Asp Cys Gln
 50 55 60
 Glu Met Asp Leu Glu Lys Thr Arg Ser Glu Arg Gly Asp Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 Val Lys Glu Lys Thr Pro Pro Asn Pro Lys His Ala Lys Thr Lys Glu
 85 90 95
 Ala Gly Asp Gly Gln Pro
 100

<210> 3

<211> 491

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ggtcgacctt cgccaggctc tctgctgact caagttcttc agttcaccgat ctctagttg 60
 cagcgatgag tgcacgagtg agatcaagat ccagaggaag aggagatggt caggaggctc 120
 ccgatgtggt tgcatctgtg gctccccgtg aatctcagca agaggaacca ccaactgaca 180
 10 atcaggatat tgaacctgga caagagagag aaggaacacc tccgatcgaa gaacgtaaag 240
 tagaaggatga ttgccaggaa atggatctgg aaaagactcg gagtgagcgt ggagatggct 300
 ctgatgtaaa agagaagact ccacctaatic taagcatgc taagactaaa gaagcaggag 360
 atgggcagcc ataagftaaa aagaagacaa gctgaagcta cacacatggc tgatgcaca 420
 ttgaaatgt gactgaaaat ttgaaattc tctcaataga gtctgagttt tctctgaaga 480

15 aaaaaaaaaa a 491

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 4

ttctagttgc agcgatgag 19

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 5

catgcttagg attaggtg

19

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende como mucho diez aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos expuesta como

5 MSARVRSRSRGRGDGX₁X₂APDVVAFVAPGESQQEEPPTDNQDIEPGQEREGTPPIEERKX₃X₄GDCQEMDX₅EKTR
SERGDGSDVKEX₆X₇PPNPKHX₈KTKEAGDGQP (SEC ID N° 1)

y comprendiendo el polipéptido uno de

 - (a) los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1 donde el aminoácido 1 (X₁) es una glutamina y el aminoácido 2 (X₂) es una leucina;
 - 10 (b) los aminoácidos 16 a 25 de la SEC ID N° 1 donde el aminoácido 1 (X₁) es una tirosina y el aminoácido 2 (X₂) es una leucina;
 - (c) los aminoácidos 59 a 68 de la SEC ID N° 1 donde el aminoácido 1 (X₃) es una valina y el aminoácido 2 (X₄) es una leucina;
 - (d) los aminoácidos 59 a 68 de la SEC ID N° 1 donde el aminoácido 1 (X₃) es una tirosina, el aminoácido 2 (X₄) es una leucina, y el aminoácido 3 (X₅) es una valina, o
 - 15 (e) los aminoácidos 84 a 92 de la SEC ID N° 1 donde el aminoácido 1 (X₆) es una tirosina, el aminoácido 2 (X₇) es una leucina y el aminoácido 9 (X₈) es una valina.
2. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1, unido preferiblemente de forma funcional a un promotor.
3. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2.
- 20 4. Un vector de acuerdo con la reivindicación 3, siendo el vector un vector plasmídico o un vector viral.
5. Un vector de acuerdo con la reivindicación 4, siendo el vector un vector plasmídico que se expresa en *Salmonella* o un vector plasmídico que se expresa en levaduras.
6. Un vector de acuerdo con la reivindicación 4, siendo el vector un vector viral.
- 25 7. Un vector de acuerdo con la reivindicación 6, siendo el vector viral un vector de retrovirus, orthopoxvirus, avipoxvirus, fowlpoxvirus, capripoxvirus, suipoxvirus, adenovirus, herpesvirus, alfavirus, baculovirus, virus Sindbis, virus vaccinia o poliovirus.
8. Una composición que comprende un primer virus recombinante que tiene incorporado en un genoma viral o parte infectable del mismo un ácido nucleico que codifica el polipéptido aislado de la reivindicación 1 y un segundo virus recombinante que tiene incorporado en un genoma viral o parte infectable del mismo uno o más genes o secuencias de ADN que codifican una molécula co-estimuladora, siendo capaz la composición de co-infectar una célula hospedadora provocando la co-expresión del polipéptido y los genes codificantes o las secuencias de ADN que codifican la molécula co-estimuladora.
- 30 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la molécula co-estimuladora uno o más de B7-1, B7-2, LFA o ICAM-1.
- 35 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en la que el segundo virus recombinante comprende adicionalmente una o más secuencias de ADN exógenas que codifican una o más moléculas inmunoestimuladoras, en la que la molécula inmunoestimuladora se selecciona entre el grupo compuesto por IL-2, ICAM-1, LFA-3, CD72, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-12, e IL-6.
- 40 11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, 9 ó 10, comprendiendo adicionalmente la composición una cantidad eficaz para la inmunomodulación de al menos uno de una molécula inmunoestimuladora exógena seleccionada entre el grupo compuesto por IL-2, GM-CSF, TNF- α , IL-12, e IL-6.
12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende el primer y segundo virus en cantidades eficaces para mejorar una enfermedad en un mamífero, siendo la enfermedad un cáncer.
- 45 13. La composición de la reivindicación 12, en la que el cáncer es cáncer uterino, cervical, de próstata o testicular.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la que el primer virus recombinante, el segundo virus recombinante, o el primer y segundo virus recombinantes se seleccionan entre el grupo compuesto por vectores de retrovirus, vectores de orthopoxvirus, vectores de avipoxvirus, vectores de fowlpoxvirus, vectores de capripoxvirus, vectores de suipoxvirus, vectores adenovirus, vectores de herpesvirus, vectores de alfavirus, vectores de baculovirus, vectores de virus Sindbis, vectores de virus vaccinia y vectores de poliovirus, preferiblemente virus vaccinia o fowlpoxvirus.
- 50 15. Una célula hospedadora transformada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7.
16. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 15, siendo la célula hospedadora una célula dendrítica o una célula tumoral.

17. Una composición farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la célula hospedadora de la reivindicación 15 ó 16 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 19. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de la reivindicación 1 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
20. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polinucleótido de la reivindicación 2 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 21. El polipéptido de la reivindicación 1 para su uso en un método para provocar una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido, preferiblemente con un adyuvante, produciendo de este modo una respuesta inmune en el sujeto.
- 15 22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 para su uso en un método para potenciar una respuesta inmune contra células que expresan PAGE4 en un mamífero, que comprende infectar las células *in vitro* con una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, para producir que las células infectadas expresen un polipéptido PAGE4 inmunogénico y administrar una cantidad de células infectadas a un mamífero afectado con células que expresan la proteína PAGE4, potenciado de este modo la respuesta inmune.
23. La composición de la reivindicación 22, siendo la composición administrable con un adyuvante.
24. La composición de la reivindicación 22 ó 23, en la que las células son células dendríticas o células tumorales.
- 20 25. El polinucleótido de la reivindicación 2 para su uso en un método para provocar una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polinucleótido, produciendo de este modo una respuesta inmune en el sujeto.
26. El polinucleótido de la reivindicación 25, en el que la composición es administrable con un adyuvante.
- 25 27. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 para su uso en un método para tratar a un sujeto con cáncer, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del vector, tratando de este modo al sujeto.
28. El vector de la reivindicación 27, siendo el vector un vector viral recombinante.
29. El vector de la reivindicación 28, comprendiendo adicionalmente el vector viral recombinante un ácido nucleico que codifica una molécula co-estimuladora, preferiblemente siendo la molécula co-estimuladora B7-1, B7-2, B7-1 B7-2, LFA e ICAM-1.
- 30 30. El polipéptido, polinucleótido o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 29, comprendiendo adicionalmente el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-15, IFN- α , G-CSF, o una combinación de los mismos.
- 35 31. El polipéptido, polinucleótido o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 29, comprendiendo adicionalmente el método administrar al sujeto un ácido nucleico que codifica uno o más de IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IFN- α , IL-15, G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L, 41 BBL e ICAM-1.
32. El polipéptido, composición, polinucleótido o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 31, comprendiendo la respuesta inmune una respuesta de células T.
- 40 33. El polipéptido, composición, polinucleótido o vector de la reivindicación 32, comprendiendo la respuesta inmune inducir células T citotóxicas que inducen la lisis de células que expresan la SEC ID N° 1.
34. El polipéptido, composición, polinucleótido o vector de la reivindicación 33, teniendo el sujeto cáncer, siendo el cáncer más particularmente cáncer uterino, cervical, de próstata o testicular.
35. El polipéptido, composición, polinucleótido o vector de la reivindicación 34, disminuyendo la respuesta inmune el crecimiento del cáncer.
- 45 36. El polipéptido, composición, polinucleótido o vector de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 35, comprendiendo adicionalmente el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico al sujeto.
37. El vector de la reivindicación 27, 28 ó 29, siendo el vector administrable como parte de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14.
- 50 38. El polipéptido de la reivindicación 1 para su uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa de próstata, comprendiendo el método,
- (i) cultivar linfocitos T citotóxicos (CTL) o células precursoras CTL con el polipéptido y una célula presentadora de antígeno para producir CTL activados o CTL madurados a partir de los precursores CTL que reconocen las células cancerosas de próstata, y

(ii) poner en contacto la célula de cáncer de mama o de cáncer de próstata con los CTL activados o CTL madurados a partir de los precursores CTL,

inhibiendo de este modo el crecimiento de la célula cancerosa de próstata.

5 39. El polipéptido de la reivindicación 38, en el que la célula cancerosa está en un sujeto, y el método comprende administrar los linfocitos T citotóxicos al sujeto.

40. El polipéptido de la reivindicación 1 o el polinucleótido de la reivindicación 2, para su uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa reproductora en un sujeto, comprendiendo el método,

poner en contacto una célula dendrítica con el polipéptido, o expresar el polinucleótido en las células dendríticas, preparando de este modo una célula presentadora de antígeno específica, y

10 administrar la célula presentadora de antígeno al sujeto, induciendo de este modo una respuesta inmune e inhibiendo el crecimiento de la célula cancerosa reproductora.

41. El polipéptido de la reivindicación 1 o el polinucleótido de la reivindicación 2, para su uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa reproductora en un sujeto, comprendiendo el método,

15 poner en contacto una célula dendrítica con el polipéptido, o expresar el polinucleótido en las células dendríticas, preparando de este modo una célula presentadora de antígeno específica, y

poner en contacto la célula presentadora de antígeno con una población de células T citotóxicas, produciendo de este modo células T citotóxicas activadas; y administrar las células T citotóxicas activadas al sujeto.

42. El polipéptido o polinucleótido de la reivindicación 41, siendo el cáncer reproductor un cáncer de próstata, de cuello del útero, testicular, o uterino.

20 43. Un método para detectar células T que expresan CD8 que reconocen específicamente la SEC ID N° 1 en un sujeto, que comprende

poner en contacto células mononucleares de sangre periférica aisladas del sujeto con el reactivo que comprende el polipéptido de la reivindicación 1;

25 detectar la presencia del reactivo unido a las células mononucleares de sangre periférica, detectando de este modo las células T que expresan CD8 que se unen específicamente a la SEC ID N° 1.

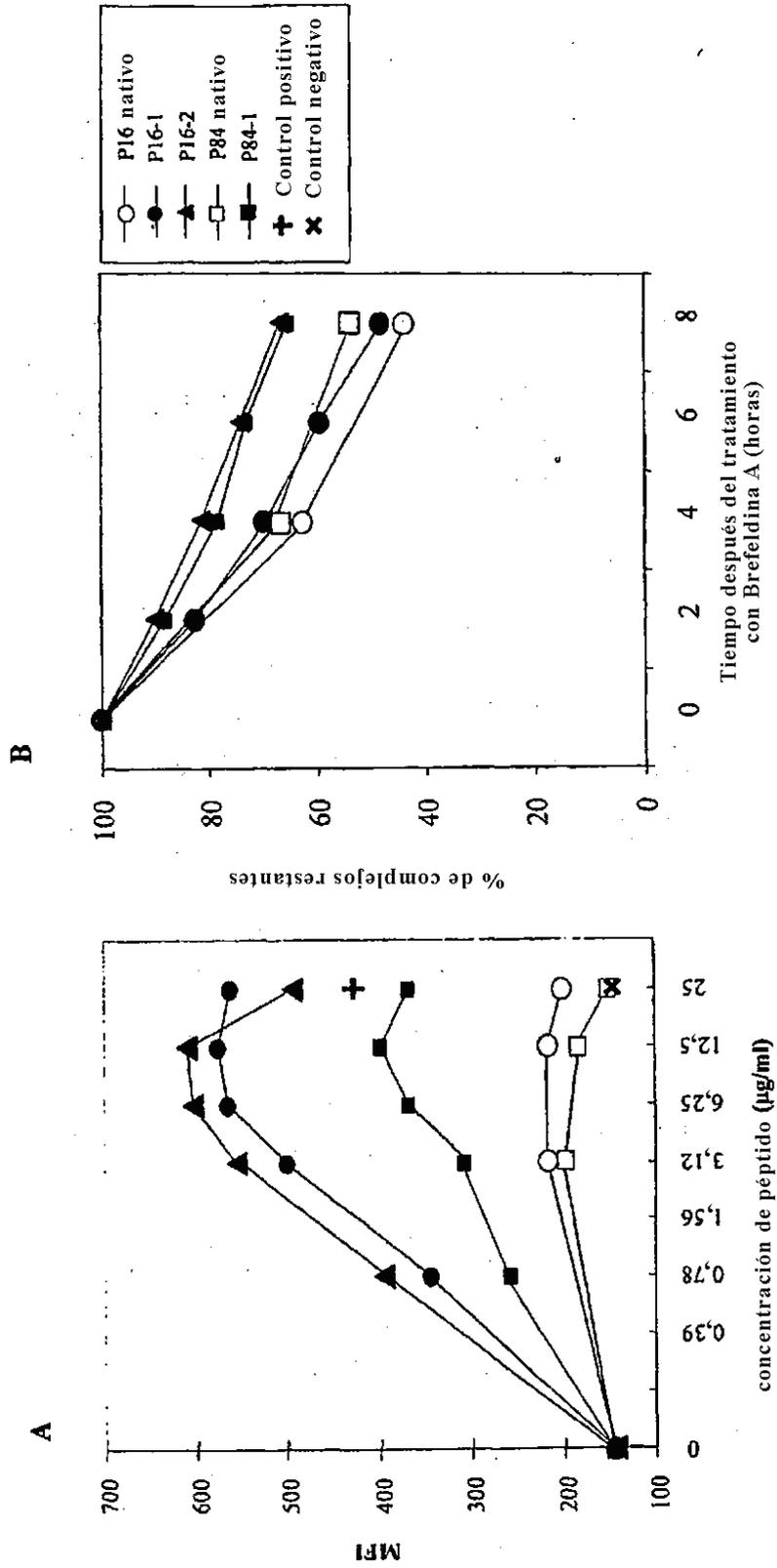


Fig. 1

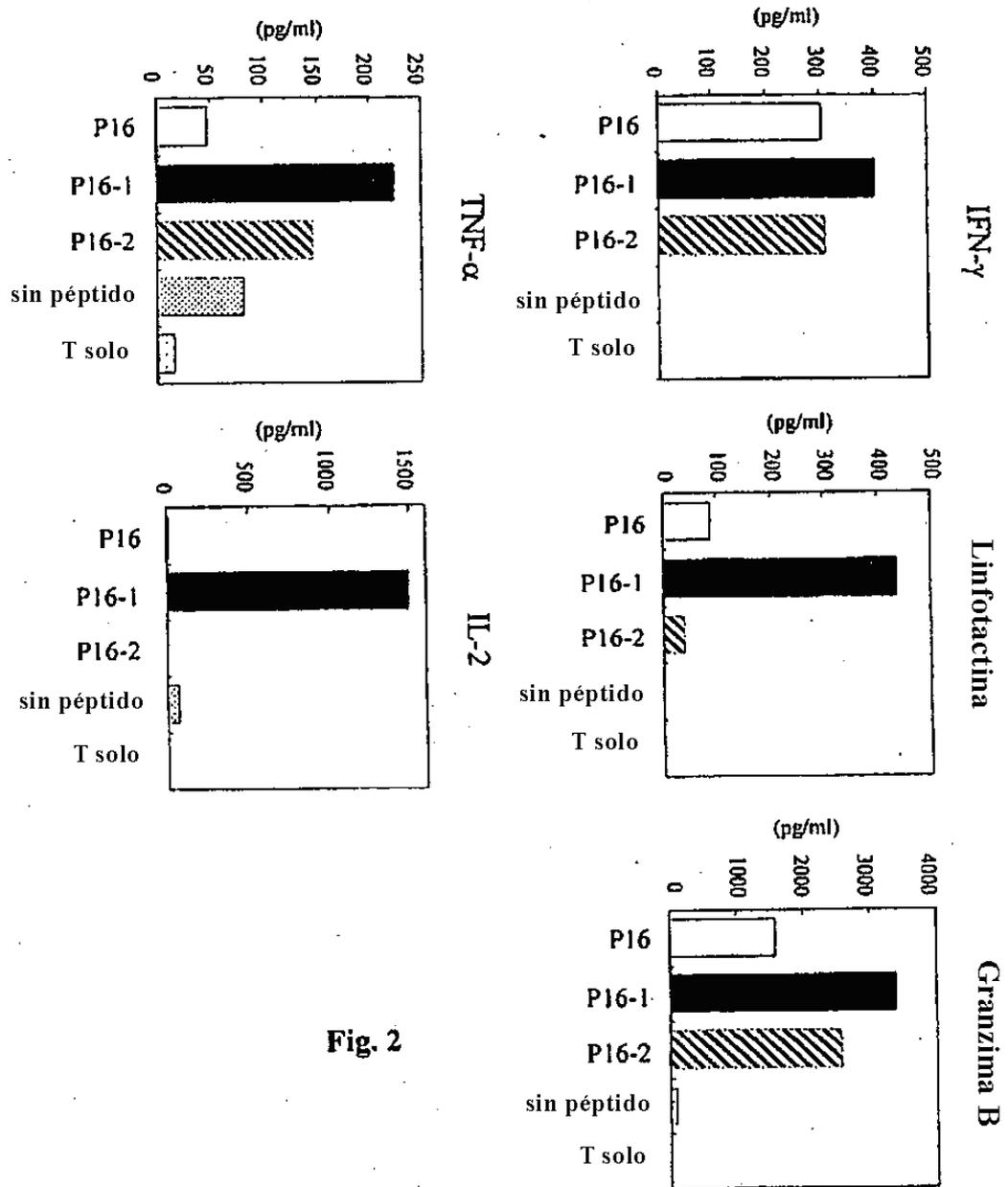


Fig. 2



Fig. 3

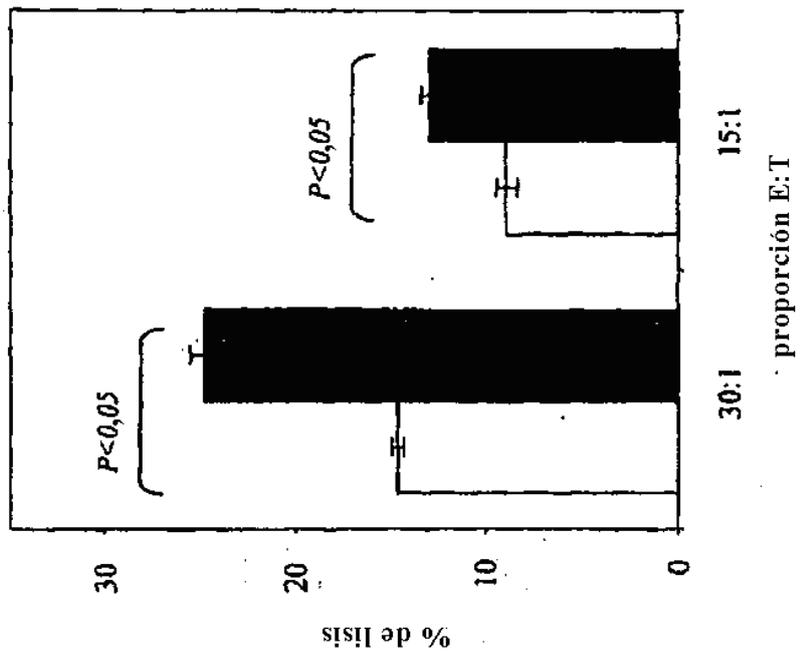


Fig. 4

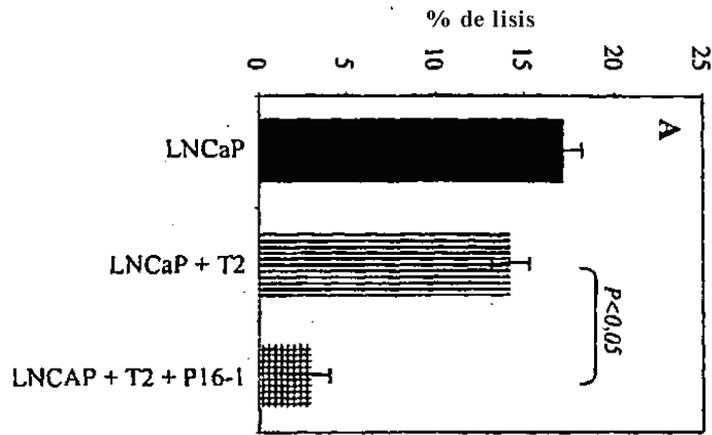
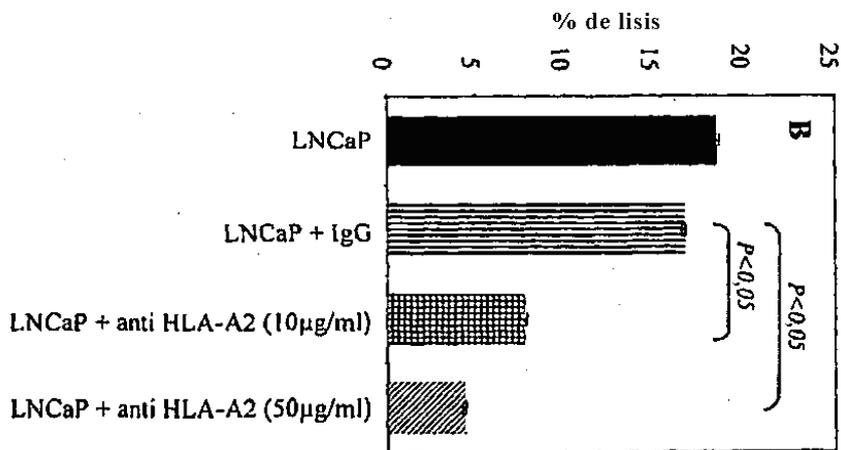


Fig. 5



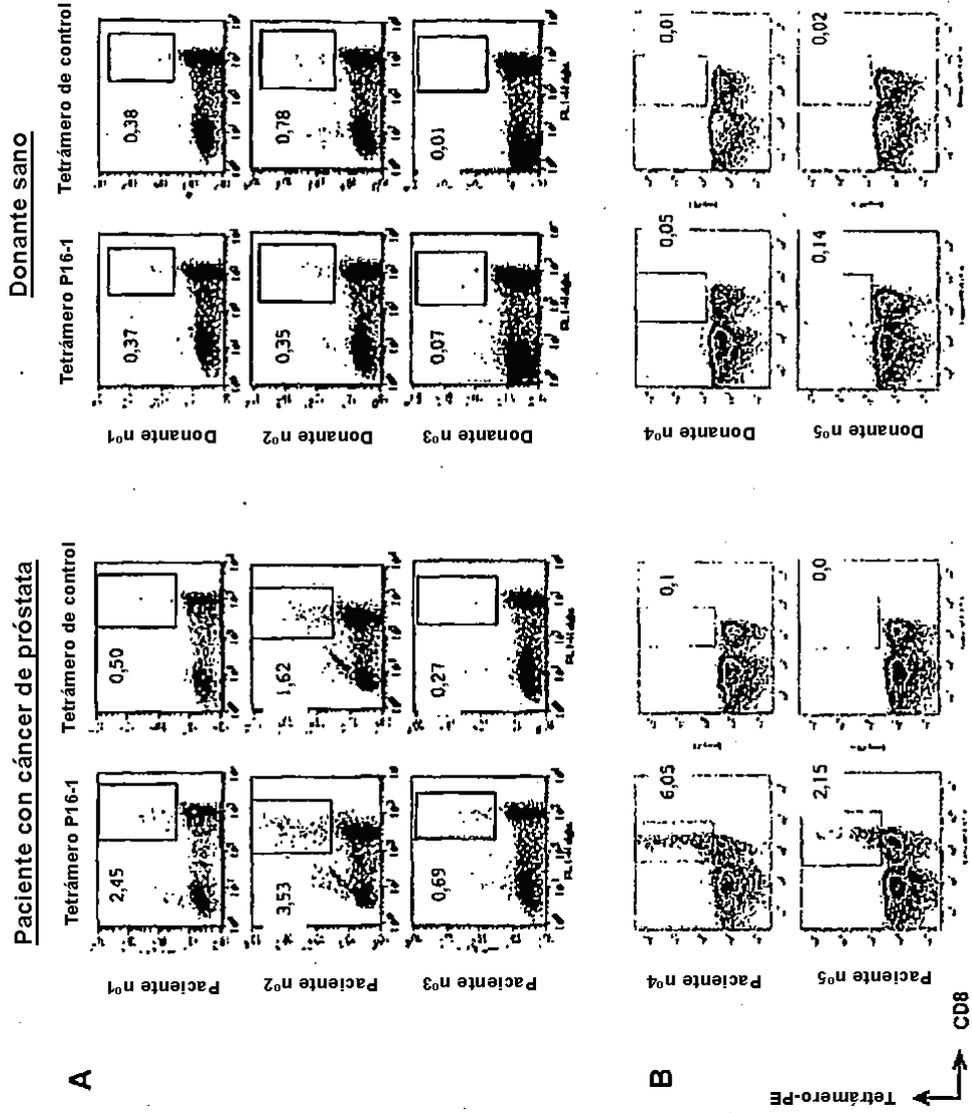


Fig. 6