



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 715**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C12N 15/27 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)	C12N 15/62 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)	C12N 5/07 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)	C07K 14/71 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)	A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01920913 .9**

96 Fecha de presentación : **30.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1272633**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Composiciones y métodos para inmunoterapia a base de células dendríticas.**

30 Prioridad: **30.03.2000 US 193504 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.07.2011

73 Titular/es: **DENDREON CORPORATION**
3005 1st Avenue
Seattle, Washington 98121, US

72 Inventor/es: **Laus, Reiner;**
Vidovic, Damir y
Graddis, Thomas

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 362 715 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

Composiciones y métodos para inmunoterapia a base de células dendríticas.

La presente invención se refiere a una proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora, que comprende un componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica y un componente de secuencia seleccionado del grupo que consiste en HER500 (SEQ ID NO:1), HER500•hGM-CSF (SEQ ID NO:2), HER500* (SEQ ID NO:3) y HER500*•rGM-CSF (SEQ ID NO:4), donde dicha proteína de fusión inmunoestimuladora es eficaz para generar una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T e inducida por células dendríticas (abreviadamente en lo sucesivo DC por la expresión inglesa *dendritic células*) contra antígenos polipeptídicos; células dendríticas tratadas con dicha composición y métodos para inmunoterapia que usan la proteína de fusión.

El gen HER-2/erbB-2 (también llamado *neu*) codifica una glicoproteína transmembranal de Mr 185.000 (p185) que posee actividad intrínseca de tirosina-quinasa (Akiyama *et al.*, 1986, *Science* 232: 1644) y presenta una homología extensiva para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Coussens *et al.*, 1985, *Science* 230: 1132).

Varias líneas de evidencia sugieren una relación entre la amplificación de HER-2 y la transformación neoplástica. La amplificación y sobre-expresión del proto-oncogén HER-2 ocurrió en cánceres de mama y ovario humanos y se correlacionó tanto con un defectuoso pronóstico como con una menor supervivencia de los pacientes (Slamon *et al.*, 1987, *Science* 235: 177; Slamon *et al.*, 1989, *Science* 244: 707).

En sistemas experimentales, los linfocitos T citotóxicos (abreviadamente en lo sucesivo CTL por la expresión inglesa *cytotoxic T lymphocytes*) específicos de antígenos son el mecanismo inmunológico más potente para la eliminación de tumores. (Greenberg, 1991, *Adv. Immunol.* 49: 281). Por lo tanto, los antígenos (Ag) específicos de tumores reconocidos por los CTL funcionan probablemente como Ag de rechazo de tumores, capaces de inducir inmunidad protectora *in vivo*.

Los CTL reconocen moléculas de la clase I que contienen fragmentos peptídicos de proteínas intracelulares que han sido transportadas al retículo endoplásmico antes de su transferencia a la molécula del complejo de histocompatibilidad principal (abreviadamente en lo sucesivo MHC por la expresión inglesa *major histocompatibility complex*) (Germain, 1995, *Ann. NY Acad. Sci.* 754:114; Heemels & Ploegh, 1995, *Annu. Rev. Biochem.* 64:463), aunque la masa de péptidos complejados de la clase II presentada a los linfocitos Th son productos de degradación de proteínas exógenas o de la superficie celular que entran en la ruta biosintética de moléculas de la clase II vía endocitosis y una fusión subsiguiente con lisosomas (Cresswell, 1994, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 259). Los CTL son inducidos cuando una proteína entra en la ruta de la clase I del complejo de histocompatibilidad principal ("MHC I" o "clase I") del procesamiento de antígenos. Para entrar en esta ruta la proteína debe estar presente en el citosol de una célula presentadora de antígenos (abreviadamente en lo sucesivo APC por la expresión inglesa *antigen presenting cell*). En dicho citosol se degrada en péptidos que se transportan luego al retículo endoplásmico, en donde se asocian con las moléculas de la clase I de los antígenos de leucocitos humanos (abreviadamente en lo sucesivo HLA por la expresión inglesa *human leukocyte antigens*). Estos péptidos se exponen luego junto con las moléculas de la clase I sobre la superficie y pueden servir como un inductor y diana de los CTL específicos de antígenos restringidos de la clase I (Rothbard *et al.*, 1987, *Nature* 326: 881).

El cebado (o iniciación) de una respuesta inmunitaria expande y activa los linfocitos "vírgenes", es decir los que no han estado en contacto previamente con un inmunógeno dado, de modo que llegan a ser células "efectoras" que responden activamente. Cada célula virgen tiene el potencial de reconocer uno y solo uno de los epítipo antigénicos; una situación análoga a una llave que encaja en su cerradura. Solamente las células que reconocen su epítipo correspondiente llegan a ser células efectoras.

Los linfocitos T pueden ser del tipo "cooperador" o "citotóxico". Los linfocitos T cooperadores secretan factores de crecimiento para células linfoides que estimulan la activación y función de los linfocitos B y T. Los linfocitos T citotóxicos reconocen y, directa o indirectamente, matan a las células que expresan un antígeno particular. Como los linfocitos B, cada linfocito T tiene receptores específicos para uno y solamente uno de los epítipos antigénicos. Los receptores de los linfocitos T reconocen fragmentos de proteínas que son presentadas en la superficie celular por los complejos de histocompatibilidad principal (MHC). La inducción *in vivo* de los CTL ha sido conseguida típicamente por inmunización con virus o células vivos (Tanaka, *et al.*, *J. Immunol.*, (1991), 147, 3646-52, Wang, *et al.*, *J. Immunol.*, (1995), 4685-4692). Una característica de las DC, un potente subconjunto de las APC, es su capacidad de desencadenar respuestas *in vivo* de linfocitos T citotóxicos (CTL) del tipo CD8⁺ vírgenes, después de ser pulsadas con antígeno (Ridge *et al.* 1998 *Nature* 393:474).

Además de su forma inmadura (en descanso o precursora), las DC existen en dos estados maduros: activado y súper-activado. Las DC activadas pueden estimular los linfocitos T cooperadores CD4⁺, pero no los linfocitos T citotóxicos (CTL) del tipo CD8⁺, mientras que las DC súper-activadas poseen la capacidad de estimular los CTL del tipo CD8⁺.

Aunque las células tumorales pueden expresar antígenos proteínicos que son reconocidos como extraños por el sujeto, y la vigilancia inmunitaria puede limitar el crecimiento y la diseminación de algunos tipos de tumores, el sis-

tema inmunitario no siempre protege al sujeto de cánceres humanos letales. Dichos tumores pueden arrollar al sistema inmunitario debido al rápido crecimiento y diseminación y/o las células tumorales pueden evitar su destrucción por el sistema inmunitario. Los mecanismos propuestos para dicha evasión incluyen, pero sin limitación: (1) sub-regulación de los antígenos del MHC de la clase I en la superficie de las células tumorales dando como resultado poco o ningún complejamiento de los antígenos peptídicos tumorales procesados con el MHC de la clase I como se requiere para el reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos (CTL); (2) una falta de activación de los CTL debido a escasa o nula expresión de las moléculas del MHC de la clase II por la células tumorales, de modo que no pueden activar directamente los linfocitos T cooperadores del tipo CD4+ específicos de tumores (que producen señales probablemente para ser necesitadas para la actividad de los CTL); (3) una carencia de co-estimulación de marcadores de la superficie celular que proporcionan señales secundarias para la activación de los linfocitos T cooperadores del tipo CD4+; y (4) factores producidos por células tumorales que suprimen las respuestas anti-tumorales, tales como los ligandos *fas* (Abbas, A.K. *et al.*, Eds., CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 3rd edition, W.B. Saunders Co., 394-405, 1997).

Por consiguiente es deseable proporcionar medios para desencadenar respuestas de los CTL contra proteínas específicas de tumores. Los CTL pueden ser inducidos bien sea *in vivo* con vacunas o bien sea pueden ser generados *in vitro* y luego re-infundidos en el organismo portador del tumor.

La solicitud de patente internacional WO97/24438 describe un complejo polipeptídico inmunoestimulador que consiste en un antígeno polipeptídico, tal como HER-2 y una proteína que se une a las células dendríticas, tal como el GM-CSF y sus uso en terapia de cáncer.

La invención está dirigida a una proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora, que comprende:

un componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica y un componente de secuencia seleccionado del grupo que consiste en HER500 (SEQ ID NO:1), HER500+hGM-CSF (SEQ ID NO:2), HER500* (SEQ ID NO:3) y HER500*+rGM-CSF (SEQ ID NO:4), donde dicha proteína de fusión inmunoestimuladora es eficaz para desencadenar una respuesta inmunitaria celular al componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica.

En un aspecto, el componente de secuencia del dominio intracelular de HER-2 de la proteína de fusión inmunoestimuladora tiene la secuencia presentada como SEQ. ID. NO: 25.

En otro aspecto, el componente polipeptídico o proteínico está asociado con células tumorales.

En general, la proteína de fusión inmunoestimuladora es producida por traducción de una secuencia codificadora continua de ácido nucleico. Sin embargo, la proteína de fusión puede ser producida también por acoplamiento químico.

En una realización preferida, el componente polipeptídico o proteínico de la proteína de fusión es la secuencia del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura presentada como SEQ. ID. NO:23.

La invención proporciona una composición de proteína de fusión inmunoestimuladora que puede mediar una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T e inducida por células dendríticas.

En un aspecto, la composición de proteína de fusión inmunoestimuladora comprende la proteína de fusión inmunoestimuladora como se ha descrito antes y células dendríticas súper-activadas por exposición *in vitro* a una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención.

La invención proporciona también un método *in vitro* de producir DC súper-activadas, exponiendo las DC a una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención, de un modo eficaz para dar como resultado una respuesta celular inmunitaria al componente de la secuencia antigénica polipeptídica o proteínica de la proteína de fusión.

La invención proporciona también la proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención para uso en inmunoterapia de cánceres primarios o metastásicos que están asociados con un antígeno particular. Las DC se obtienen de un donante humano, expuesto a una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención de un modo y durante un tiempo eficaz para dar como resultado DC súper-activadas cargadas de antígenos. Dichas células DC han de ser administradas luego a un sujeto que tiene un cáncer asociado con la expresión del componente polipeptídico o proteínico de la proteína de fusión inmunoestimuladora, dando como resultado una respuesta inmunoterapéutica inhibidora del crecimiento contra el cáncer o tumor primario o metastásico. En dichos casos, la administración de dichas DC súper-activadas puede llevarse a cabo en combinación con la co-administración al paciente de una proteína de fusión inmunoestimuladora.

En otra propuesta relacionada, la invención proporciona el uso de la proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención o una DC súper-activada como se ha descrito antes para tratar el cáncer, en donde el cáncer está asociado con la expresión de un antígeno particular. Por tanto, la proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención ha de ser administrada a un paciente al que se le ha diagnosticado el cáncer de un modo eficaz para dar como resulta-

do una respuesta inmunitaria al componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica de la proteína de fusión.

En una realización ilustrativa de estos aspectos de la invención, el cáncer es carcinoma de mama, cáncer de ovario o cáncer de colon y el componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica de la proteína de fusión inmunostimuladora es la secuencia del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura presentada como SEQ. ID. NO: 23.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la respuesta del hibridoma B3Z de linfocitos T del tipo CD8⁺ dependientes de la clase I del MHC de ratón, [específico para la ovoalbúmina de pollo "OVA" derivada del péptido inmunodominante SIINFEKL (Jame-
son *et al.*, 1993, *J. Exp. Med.* 177: 1541)], que secreta interleuquina-2 (IL-2) a diversos antígenos (Ag) presentados por células dendríticas (DC) súper-activadas singeneicas. CPM se refiere a las cuentas por minuto; cpm se refiere a diferencias entre las cpm absolutas para un grupo de ensayo dado menos el valor de las cpm de fondo obtenido en ausencia de los Ag solubles (en el experimento mostrado este valor fue 9.581). La composición de los diversos antígenos está indicada en la Figura y se describe más adelante.

La Figura 2A muestra los resultados de un experimento dirigido al efecto de la pre-inmunización con DC súper-activadas pulsadas con Ag sobre la supervivencia de ratones hasta 42 días después de la inoculación con células tumorales, usando "nada" (cuadrados en blanco), "HER300*⁺rGM-CSF" (triángulos en negro) y "HER500*⁺rGM-CSF" (círculos en blanco), como el agente inmunizante.

La Figura 2B muestra los resultados de otro experimento dirigido al efecto de la pre-inmunización con DC súper-activadas pulsadas con Ag sobre la supervivencia de ratones hasta 77 días después de la inoculación con células tumorales, usando "nada" (círculos en blanco, 7 ratones), "HER500*" (cuadrados en blanco, 7 ratones), HER500*⁺rGM-CSF (triángulos en negro, 8 ratones), "HER500" (círculos en negro, 7 ratones) y "HER500*⁺hGM-CSF" (rombos en negro) como el agente inmunizante.

La Figura 3 muestra los resultados de otro experimento dirigido al efecto de la inmunización pos-infección con DC súper-activadas pulsadas con Ag sobre la supervivencia de ratones (10/grupo) hasta 63 días después de la inyección de células tumorales, usando "nada" (cuadrados en blanco), "HER500*⁺rGM-CSF" (triángulos en negro), "HER500*" (rombos en negro) y "HER500*⁺hGM-CSF" (círculos en blanco) como el agente inmunizante.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

A no ser que se indique otra cosa los términos siguientes tienen los significados que se facilitan a continuación:

Tal como se usa en la presente memoria "presentación de antígenos proteínicos solubles en el contexto de las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC I)" significa que el antígeno proteínico soluble o sus fragmentos, se presentan junto con las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad sobre la superficie celular y pueden servir como inductor y diana de los CTL específicos de antígenos restringidos a la clase I.

Como se usa en la presente memoria el término "pulso" significa exposición de las APC al antígeno durante un tiempo suficiente para promover la presentación del antígeno sobre la superficie de las APC.

Como se usa en la presente memoria el término "células modificadas que presentan antígeno" (APC modificadas) o "células dendríticas modificadas" (DC modificadas) se refiere a una población de APC o DC, respectivamente, que han sido tratadas (pulsadas) *ex vivo* de un modo eficaz para dar como resultado una mayor capacidad para presentar antígenos en el contexto de la clase I del MHC con relación a las APC o DC que no han sido modificadas.

El término "más eficazmente" cuando se usa en la presente memoria con respecto a la presentación de antígenos proteínicos solubles significa un aumento de al menos 2 veces en la magnitud de la respuesta de linfocitos T detectables después de la presentación de un antígeno proteínico soluble por las APC. Por ejemplo, esto significa que se detecta un aumento de al menos 2 veces en la magnitud de la respuesta de los linfocitos T tras la presentación de un antígeno dado mediante un número definido de APC con respecto a la magnitud de la respuesta de los linfocitos T obtenida cuando un antígeno diferente o modificado es presentado por el mismo número de APC en las mismas condiciones de cultivo y a una concentración de Ag equimolar.

Como se usa en la presente memoria, "células presentadoras de antígenos" (APC) son cualesquiera células que, tras ser pulsadas con Ag, pueden activar los linfocitos T.

Como se usa en la presente memoria, "células dendríticas" o "DC", son el subconjunto más potente de las APC que son típicamente células grandes veladas que extienden dendritas cuando se cultivan *in vitro*.

Como se usa en la presente memoria, "DC activadas" son DC maduras que pueden estimular linfocitos T cooperadores del tipo CD4⁺, pero no linfocitos T citotóxicos (CTL) del tipo CD8⁺.

Como se usa en la presente memoria, "DC súper-activadas" son DC maduras que pueden estimular linfocitos T citotóxicos (CTL) del tipo CD8⁺.

- 5 Como se usa en la presente memoria el término "aloestimulador" significa capaz de estimular linfocitos T alogéneos debido a diferencias en moléculas del MHC expresadas en la superficie celular.

Un "antígeno" o "Ag" se refiere a una sustancia que reacciona sola o en el contexto de las moléculas del MHC con los productos de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, anticuerpos, receptores de los linfocitos T) que han sido estimulados por un inmunógeno específico. Los antígenos incluyen por tanto los inmunógenos específicos que dan lugar a la respuesta (por ejemplo, péptidos, proteínas o polisacáridos antigénicos), así como las entidades que contienen o expresan los inmunógenos específicos (por ejemplo, virus, bacterias, etc.).

- 10

Como se usa en la presente memoria, "inmunógeno" se refiere a una sustancia que es capaz de estimular o inducir una respuesta inmunitaria humoral por anticuerpos y/o mediada por células.

- 15 Las "DC cargadas con Ag", incluyen DC y diversos tipos de células mononucleares de sangre periférica (abreviadamente en lo sucesivo PBMC por la expresión inglesa *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) que incluyen APC profesionales y monocitos/macrófagos, que han estado expuestos a un antígeno y activados por el Ag. Las DC pueden llegar a estar cargadas con Ag *in vitro*, por ejemplo, por cultivo *ex vivo* en presencia de un Ag tumoral, o *in vivo* por exposición a un antígeno tumoral.

- 20 Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula dendrítica súper-activada" se refiere a las DC o precursoras de DC que han sido tratadas *ex vivo* de tal modo que tienen una mayor capacidad para presentar antígenos en el contexto de moléculas de la clase I del MHC con respecto a las DC no tratadas.

- 25 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "composición de proteína de fusión inmunoestimuladora" y "composición de proteína de fusión antigénica", se pueden usar intercambiamente y se refieren a una proteína de fusión de la invención que comprende un componente de secuencia antigénica y un componente de secuencia de dominio intracelular de HER-2 solo y/o DC que han sido expuestas a dicha proteína de fusión, como se describe adicionalmente más adelante.

- 30 Como se usa en la presente memoria, "OVA" se refiere a ovoalbúmina natural; "*" se refiere al péptido SIINFEKL inmunodominante derivado de OVA; "HER500" se refiere a la proteína HER-2 humana de fusión recombinante que consiste en una mitad de su porción extracelular fusionada a 1/4 de su parte intracelular; "HER500*" se refiere a la proteína de fusión recombinante hecha de HER500 y el péptido SIINFEKL inmunodominante derivado de OVA insertado entre sus componentes extracelular e intracelular; "HER500*•rGM-CSF" se refiere a la proteína de fusión recombinante compuesta de HER500* y el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) de rata; "HER500•hGM-CSF" se refiere a la proteína de fusión recombinante compuesta de HER500 y GM-CSF humano; y "HER300*•rGM-CSF" se refiere a la proteína HER-2 humana de fusión recombinante que consiste en una mitad de porción extracelular fusionada al péptido SIINFEKL inmunodominante derivado de OVA y GM-CSF de rata, como se resume más adelante.

- 35

Por "respuesta mediada por linfocitos T protectores" se quiere significar la actividad de los linfocitos T que conduce a la ralentización o disminución del crecimiento de células cancerosas o de un tumor sólido, o una reducción del número total de células cancerosas o carga tumoral total.

- 40 Por célula "cancerosa o tumoral" se quiere significar una célula que exhibe una pérdida del control de su crecimiento y forma inusualmente grandes clones de células. Las células tumorales o cancerosas han perdido generalmente la inhibición por contacto y pueden ser invasivas y/o tener la capacidad de metastizar.

- 45 "Antígenos tumorales" se refiere a los Ag asociados con un tipo particular de cáncer o tumor, incluyendo los Ag asociados a tumores y los Ag específicos de tumores. Ejemplos de antígenos tumorales se facilitan más adelante en el apartado IIA.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "resultado terapéutico mejorado" con respecto a un paciente de cáncer se refiere a una ralentización o disminución del crecimiento de las células cancerosas o un tumor sólido, o una reducción del número total de células cancerosas o carga tumoral total.

- 50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "resultado terapéutico mejorado" con respecto a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad infecciosa, se refiere a una ralentización o disminución del crecimiento del agente infeccioso causante dentro del sujeto y/o una disminución o eliminación de los síntomas detectables asociados típicamente con la enfermedad infecciosa.

II. Respuesta inmunitaria a antígenos polipeptídicos solubles

En sistemas experimentales los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígenos tumorales son el mecanismo inmunológico más potente para la eliminación de tumores. Los CTL pueden ser inducidos *in vivo* con vacunas o pueden ser generados *in vitro* y luego re-infundidos en el organismo que lleva el tumor. La inducción *in vivo* de los CTL se consigue típicamente por inmunización con virus o células vivos (Tanaka, *et al.*, *J. Immunol.*, (1991), 147, 3646-52; Wang, *et al.*, *J. Immunol.*, (1995), 4685-4692).

Con la excepción de unas cuantas proteínas virales especiales, tal como el antígeno T grande del SV-40 y el antígeno de superficie de la hepatitis B, la inyección de proteínas aisladas o solubles no da como resultado la inducción de CTL (Schirmbeck, *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, (1993), 23, 1528-34). Los CTL son inducidos cuando una proteína entra en la ruta de la clase I del complejo de histocompatibilidad principal ("MHC I" o "clase I") del procesamiento de antígenos. Para entrar en esta ruta la proteína debe estar presente en el citosol de una célula presentadora de antígenos (APC). Allí se degrada en péptidos que se transportan luego al retículo endoplásmico, en donde se asocian con las moléculas de clase I del HLA. Estos péptidos se presentan luego junto con las moléculas de la clase I en la superficie celular y pueden servir como inductores y dianas de los CTL específicos de antígenos restringidos a la clase I. Fisiológicamente solo las proteínas que se sintetizan endógenamente por las APC entran en esta ruta.

El cebado (o iniciación) de una respuesta inmunitaria expande y activa los linfocitos "vírgenes", es decir, los que no han estado previamente en contacto con un inmunógeno para llegar a ser células "efectoras" que responden activamente. Cada célula virgen tiene el potencial de ponerse en contacto con uno y solo uno de los epítomos antigénicos, una situación análoga a una llave que encaja en su cerradura. Solamente las células que reconocen su epítomo correspondiente llegan a ser células efectoras.

Los linfocitos T pueden ser del tipo "cooperador" o "citotóxico". Los linfocitos T secretan factores de crecimiento para las células linfoides que estimulan la activación y función de los linfocitos B y T. Los linfocitos T citotóxicos reconocen y, directa o indirectamente, matan a células que expresan un antígeno particular. Como los linfocitos B, cada linfocito T tiene receptores específicos para uno y solo uno de los epítomos antigénicos. Los receptores de los linfocitos T reconocen fragmentos de proteínas que son presentados en la superficie celular por los complejos de histocompatibilidad principal (MHC).

Hay dos tipos diferentes de proteínas del MHC, la clase I y la clase II, ambas de las cuales presentan fragmentos de proteínas degradados proteolíticamente a los linfocitos T. Las moléculas de la clase I que se expresan en la mayoría de las células del cuerpo y presentan fragmentos de proteínas sintetizadas endógenamente a los linfocitos T citotóxicos. Las moléculas de la clase II que se expresan en células presentadoras de antígenos (APC) especializadas, tales como macrófagos, monocitos, células dendríticas y linfocitos B presentan fragmentos de proteína a los linfocitos T cooperadores. (Chen, CH and Wu, TC, *J. Biomed. Sci.*, 5(4):231-52, 1998).

En la mayoría de los casos las moléculas de la clase I presentan proteínas extrañas sintetizadas en una célula. Para la presentación por la clase II, la proteína extraña puede ser sintetizada en la célula o absorbida por la célula desde el exterior (es decir, presentada en la forma de una proteína o péptido libre). Si un antígeno es sintetizado en una célula y presentado por ambas moléculas de la clase I y de la clase II, se producen tanto linfocitos B productores de anticuerpos como linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, si un antígeno se origina fuera de una célula y es expresado solamente por la clase II, la respuesta inmunitaria específica está limitada principalmente a los linfocitos T cooperadores y a la producción de anticuerpos. [*THE SCIENTIFIC FUTURE OF DNA FOR IMMUNIZATION*, American Academy of Microbiology, Robinson, *et al.*, Eds., 1-29, 1997].

Por consiguiente, la respuesta típica a los antígenos proteínicos solubles es una respuesta mediada por la clase II. La presente invención representa composiciones y métodos que permiten a los antígenos proteínicos solubles entrar en la ruta de presentación de la clase I.

Además alguna progenie de linfocitos T estimulados por antígenos no se desarrollan en células efectoras, sino que llegan a ser células de memoria que son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ausencia de un enfrentamiento antigénico adicional. Dichas células de memoria son quiescentes y no producen moléculas efectoras a no ser que sean estimuladas por antígenos. (Véase, por ejemplo, Abbas, AK *et al.*, Eds. *CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY*, W.B. Saunders Co., páginas 116-123; 130-134, 1997).

Los linfocitos T vírgenes (o linfocitos T que no han sido expuestos previamente a un antígeno dado) requieren solamente para sobrevivir la molécula de restricción de la clase I del MHC, sin embargo para expandirse, también deben ser expuestos al antígeno. En contraste, los linfocitos T de memoria tienen un menor umbral de activación funcional que facilita respuestas secundarias que son más rápidas y más fuertes que las de los linfocitos T vírgenes.

A. Antígenos polipeptídicos

La presente invención se basa en el descubrimiento de que composiciones inmunoestimuladoras que comprenden un componente antigénico polipeptídico y un componente de secuencia derivada del dominio intracelular de la proteína HER-2 son eficaces para generar una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T e inducida por DC contra el antígeno polipeptídico.

Los antígenos polipeptídicos de interés particular son los asociados con células cancerosas, tumores y/o agentes infecciosos.

Por ejemplo, los "antígenos específicos de tumores" y los "antígenos asociados a tumores" que son característicos de un tipo de tejido particular, incluyendo tejidos tumorales particulares, encuentran utilidad en la proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, pero sin limitación: HER-2/neu; fosfatasa prostática ácida (PAP); MART-1 (asociado con melanoma; Coulie, *et al.*, *J. Exp. Med.* 180:35, 1994; Hawakami, *et al.*, *PNAS* 91:3515, 1994; Bakker, *et al.*, *J. Exp. Med.* 179:1005, 1994); los precursores de los antígenos de rechazo de tumores, MAGE, BAGE y GAGE; NY-ESO (clonado de un cáncer de esófago); SART-3 (un antígeno de carcinoma de células escamosas), antígenos de inmunoglobulinas específicos para linfomas de linfocitos B particulares, antígenos asociados a tumores, tales como antígeno carcinoembrionario (CEA), p53, c-myc, molécula de adhesión a células neurales (N-CAM) y mucina epitelial polimórfica (PEM), además de cualquiera de las proteínas expresadas en células tumorales.

También son de interés antígenos específicos para agentes infecciosos particulares, por ejemplo, agentes virales incluyendo, pero sin limitación: el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la gripe, virus del papiloma humano (HPV), virus de la glosopeda (virus coxsackie), virus de la rabia, virus herpes simplex (HSV), y los agentes causantes de gastroenteritis, incluyendo rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus y virus Norwalk; agentes bacterianos, incluyendo pero sin limitación: *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae*, agentes fúngicos y parásitos, tales como *Giardia*.

HER-2, un antígeno ilustrativo para uso en proteínas de fusión inmunoestimuladoras

Los tumores malignos expresan cierto número de proteínas incluyendo moléculas que pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2.

Análogamente, se han identificado antígenos peptídicos productos de oncogenes que son comunes a tipos específicos de tumores. Estos polipéptidos encuentran uso como reactivos que pueden estimular generalmente respuestas de linfocitos T eficaces para reaccionar con tumores que llevan dichos antígenos. El antígeno peptídico producto del oncogén, HER-2/neu (Beckmann *et al.*, *Eur. J. Cancer* 28:322, 1992) está asociado con cánceres de mama y ginecológicos humanos.

La asociación de la sobre-expresión de HER-2 en células cancerosas con fenotipos malignos y quimio-resistencia es consistente con un mal resultado clínico para pacientes con tumores que sobre-expresan HER-2. Lo siguiente es un breve resumen de la sobre-expresión de HER-2 asociada con diversos cánceres:

La amplificación y sobre-expresión del gen HER-2 se encuentra en 25-30% de los cánceres de mama primarios y se asocia con un mal resultado clínico. Estudios *in vitro* la sub-regulación del receptor de estrógenos (ER), promovida por la sobre-expresión de HER-2, en células tumorales de mama dependientes de estrógenos (Pietras *et al.*, 1995, *Oncogene* 10: 2435), consistente con datos clínicos que muestran que la sobre-expresión de HER-2 está asociada con el fenotipo ER negativo (Zeillinger *et al.*, 1989, *Oncogene* 4: 109; Adnane *et al.*, 1989, *Oncogene* 4: 1389), y el fracaso de la terapia con tomoxifeno en pacientes con sobre-expresión de HER-2 (Wright *et al.*, 1992, *Br. J. Cancer* 65:118).

Un estudio en pacientes con cáncer colo-rectal demostró que el nivel de expresión de HER-2 estaba correlacionado con el progreso de cáncer colo-rectal, el periodo exento de recidivas y el tiempo de supervivencia después de operación, y podría servir como un factor de pronóstico independiente en cánceres colo-rectales positivos al HER-2 (Kapitanovic *et al.*, 1997, *Gastroenterology* 112: 1103).

La expresión de la proteína HER-2 ha sido descrita también como un indicador de pronóstico independiente en cánceres de ovario (Slamon *et al.*, 1989, *Science* 244: 707) y cánceres endometriales (Saffari *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 5693).

La sobre-expresión de HER-2 en células NIH/3T3 dio como resultado transformación celular y crecimiento tumoral en ratones atímicos (Di Fiore *et al.*, 1987, *Science* 237: 178; Hudziak *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7159). Experimentos celulares y con animales han mostrado que la actividad de tirosina-quinasa de HER-2 aumentada aumentó la expresión de fenotipos malignos (Hudziak *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7159; Muller *et al.*, 1988, *Cell* 54: 105; Yu & Hung, 1991, *Oncogene* 6:1991; Yu *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 891; Zhau *et al.*, 1996, *Prostate* 28: 73). Los ratones transgénicos que expresan el oncogén c-neu activado accionado por un promotor de tumor mamario de ratón desarrollaron tumores mamarios sincronamente múltiples que implican las glándulas completas (Muller *et al.*, 1988, *Cell* 54: 105).

La sobre-expresión de HER-2 se describió también para inducir resistencia a fármacos quimioterapéuticos en NSCLC, adenocarcinoma gástrico y cánceres de mama (Tsai *et al.*, 1993, *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 897; Tsai *et al.*,

1995, *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 682; Paik *et al.*, 1991, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 32:291; Wright *et al.*, 1992, *Br. J. Cancer* 65:118).

Loa antígenos peptídicos y polipeptídicos de HER-2 pueden ser aislados, sintetizados o expresados recombinantemente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. La secuencia de DNA que codifica HER-2/Neu/ErbB-2 se puede encontrar en el N° de acceso en GenBank M11730 (mRNA de c-erb-B-2 humano).

Dichos antígenos de HER-2 aislados pueden ser complejados con cualquiera de cierto número de moléculas que aumenten la respuesta inmunitaria al antígeno, como se indica más adelante, bien químicamente, o como proteínas de fusión producidas recombinantemente, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

III. Proteínas de fusión inmunoestimuladoras

La presente invención se basa en el descubrimiento de que las proteínas de fusión inmunoestimuladoras que comprenden un componente de secuencia antigénica polipeptídica y un componente de secuencia derivado del dominio intracelular de la proteína HER-2 son eficaces para generar una respuesta inmunitaria protectora mediada por linfocitos T e inducida por DC contra el componente antigénico de la proteína de fusión.

Un dominio intracelular ilustrativo de la proteína HER-2 se presenta en esta memoria, sin embargo, se entenderá que fragmentos más cortos de una secuencia ilustrativa pueden exhibir también actividad. Más importantemente, se ha demostrado que un componente de secuencia derivado del dominio intracelular de la proteína HER-2 contribuye a la actividad inmunoestimuladora de las proteínas de fusión que comprenden dichos componentes de secuencia.

Una construcción de proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención puede incluir también uno o más componentes de secuencia seleccionados del grupo que consiste en GM-CSF, una secuencia informadora tal como el octapéptido derivado de OVA inmunodominante SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), uno o más secuencias peptídicas señal y una etiqueta de purificación, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos C-terminal añadida.

Las construcciones de proteínas de fusión inmunoestimuladoras ilustrativas descritas en la presente memoria tienen una secuencia¹ señal de PAP de 32 aminoácidos, una secuencia² de PAP madura de 3 aminoácidos, una secuencia³ señal de HER-2 de 3 aminoácidos, y una secuencia de etiqueta de purificación de aminoácidos C-terminal de 9 residuos de aminoácidos que comprende tres alaninas consecutivas y seis histidinas consecutivas, o una secuencia de etiqueta de aminoácidos C-terminal de 15 residuos de aminoácidos que comprende glicina, alanina, 4 prolina consecutivas, tres alaninas consecutivas, y seis histidinas consecutivas y las características resumidas en la Tabla 1 siguiente

Tabla 1. Componentes de proteínas de fusión de HER-2 ilustrativas.

Construcción	Secuencia extracelular de HER-2 ⁴	SIINFEKL (OVA ₂₅₇₋₂₆₄)	Secuencia ⁵ intracelular de HER-2	GM-CSF
HER500	+	-	+	-
HER500•hGM-CSF	+	-	+	127 aa (humano)
HER500*	+	+	+	-
HER500*•rGM-CSF	+	+	+	127 aa (rata)
HER300*•rGM-CSF	+	+	-	127 aa (rata)

¹ 32 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1 a 32 de N° de acceso en Genebank. NM_001099

² 3 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 33 a 35 de N° de acceso en Genebank NM_001099.

³ aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 19 a 21 de N° de acceso en Genebank M11730.

⁴ 289 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 22 a 310 de N° de acceso en Genebank M11730.

⁵ 217 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1038 a 1254 de N° de acceso en Genebank M11730

Se entenderá que una proteína de fusión que comprende un componente de secuencia antigénica polipeptídica y un componente de secuencia derivada del dominio intracelular de la proteína HER-2 son solamente eficaces para generar una respuesta inmunitaria protectora mediada por linfocitos T e inducida por DC contra el componente antigénico de la proteína de fusión.

Por consiguiente, la secuencia SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), la secuencia señal de PAP; la secuencia de aminoácidos de PAP madura, la secuencia señal de HER-2, y la secuencia de etiqueta peptídica C-terminal expuestas anteriormente no son necesarias para generar dicha respuesta.

Las proteínas de fusión inmunoestimuladoras de la invención pueden ser modificadas uniéndolas, covalentemente o no covalentemente, con una molécula informadora. En la técnica se conocen una amplia variedad de moléculas informadoras y la selección de dicha molécula informadora determina el formato del ensayo. Por ejemplo, como se detalla en el Ejemplo 1, el octapéptido inmunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) se incorporó en construcciones de fusión de HER-2 inmunoestimuladoras ilustrativas y se evaluó la presentación de antígenos de las construcciones. Dicho resumidamente, el hibridoma B3Z de linfocitos T de ratón que secreta IL-2, que responde a SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₅₄), cuando se unió a la clase I del MHC de ratón, fue estimulado con DC que fueron pre-pulsadas con las construcciones de fusión de HER-2, y la magnitud de la respuesta se evaluó midiendo la incorporación de [³H]timidina en proliferar las células dependientes de IL-2, como un indicador de la presentación de antígenos.

Ejemplos adicionales de proteínas de fusión para uso en llevar a cabo la invención incluyen, pero sin limitación, los que incluyen la secuencia de un antígeno de cáncer directamente fusionado a los 217 aminoácidos del dominio de HER-2 intracelular distal de membrana, sin componentes adicionales del conector o péptido señal. Ejemplos de dichas proteínas de fusión incluyen, pero sin limitación: una proteína de fusión que comprende 180 aminoácidos del antígeno de cáncer de testículos autoinmunogénico humano, NYESO-1 (aminoácidos 1 a 180 de N° de acceso en GenBank. U87459), fusionado a los 217 aminoácidos del dominio de HER-2 intracelular distal de membrana (aminoácidos 1038 a 1254 de N° de acceso en GenBank M11730), presentado en esta memoria como la SEQ ID NO: 27, cuya secuencia codificadora es presentada como SEQ ID NO: 28); una proteína de fusión que comprende 962 aminoácidos del antígeno de carcinoma de células escamosas, SART3-IC (aminoácidos 1 a 962 de N° de acceso en GenBank N° AB020880), fusionado a los 217 aminoácidos del dominio de HER-2 intracelular distal de membrana (aminoácidos 1038 a 1254 de N° de acceso en GenBank M11730), presentada en la presente memoria como SEQ ID NO: 29, cuya secuencia codificadora es presentada como SEQ ID NO: 30).

Como es conocido en la técnica, se puede producir también un polipéptido recombinante como una fusión con un polipéptido heterólogo, tal como una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia señal es específica para el sistema vector/célula hospedante usado para expresar la proteína recombinante.

Los polipéptidos recombinantes o proteínas de fusión que incluyen una secuencia de etiqueta colocada por ejemplo en el extremo amino o carboxilo del polipéptido son también conocidos en la técnica. La secuencia de etiqueta permite que el polipéptido sea fácilmente detectado usando un anticuerpo contra la etiqueta y facilita la purificación por afinidad del polipéptido.

El factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) ha sido incluido en construcciones de fusión ilustrativas de la invención. El GM-CSF, una glicoproteína con un peso molecular aparente de aproximadamente 23-33.000 por SDS-PAGE, es una citoquina que tiene función pleiotrópica tanto en hematopoyesis así como en inmunología. Para el GM-CSF humano y de rata se ha demostrado que se unen a células de los linajes celulares monocitos-macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. La unión de GM-CSF a receptores de alta afinidad da como resultado la rápida internalización y degradación del GM-CSF (Metcalf and Nicola en THE HEMOPOIETIC COLONY-STIMULATING FACTORS, Cambridge University Press, NY (1995)). El efecto inmunoestimulador de un complejo polipeptídico que consiste esencialmente en GM-CSF y un antígeno polipeptídico se describe además en la solicitud de patente USSN 08/579823 (aceptada), expresamente incorporada en la presente memoria como referencia. Ambos GM-CSF humano y de ratas se sintetizan con una secuencia delantera hidrófoba de 17 aminoácidos que es escindida proteolíticamente durante la secreción. Los polipéptidos maduros tienen una longitud de 127 aminoácidos, y las secuencias pueden encontrarse en los N° de acceso en GenBank NM_000758 y U00620, respectivamente.

Se apreciará que la secuencia⁶ extracelular de HER-2 descrita en la presente memoria es un ejemplo de una secuencia antigénica que puede ser incorporada en una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención. Se deduce que cualquiera de cierto número de antígenos asociados con células tumorales o un agente infeccioso, puede ser similarmente incorporado en una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención y ser eficaz para generar una respuesta inmunitaria protectora mediada por linfocitos T e inducida por DC contra el componente antigénico de la proteína de fusión. Los antígenos ilustrativos son los descritos adicionalmente en el apartado IIA.

Composiciones antigénicas de HER-2 ilustrativas

Una proteína de fusión inmunoestimuladora se prepara por unión química de un componente de secuencia antigénica al componente de secuencia derivada del dominio intracelular de la proteína HER-2 o por expresión de una secuencia codificadora de ácido nucleico recombinante y continua que se expresa como una proteína de fusión. La unión química y/o la expresión de la proteína recombinante pueden ser usadas también para incorporar secuencias peptídicas adicionales en la proteína de fusión, por ejemplo, una secuencia informadora, una secuencia de péptido señal y/o una etiqueta de purificación.

⁶ 289 aminoácidos corresponden a los aminoácidos 22 a 310 del N° de acceso en Genbank M11730.

Las secuencias codificadoras de ácido nucleico recombinante y continuo derivadas de HER-2 humano que han sido expresadas como proteínas de fusión se describen más adelante.

La construcción HER500 ilustrativa (SEQ ID NO:6) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluye en la dirección 5' a 3': la secuencia codificadora para la secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, la secuencia codificadora para una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, la secuencia codificadora para la secuencia señal de HER-2 de 3 aminoácidos, la secuencia codificadora para los 289 aminoácidos del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura, la secuencia codificadora para los 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2 y la secuencia codificadora para tres alaninas consecutivas, y seis histidinas consecutivas.

La construcción ilustrativa HER500•hGM-CSF (SEQ ID NO:7) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluye en la dirección 5' a 3': la secuencia codificadora para una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, la secuencia codificadora para una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, la secuencia codificadora para una secuencia señal de HER-2 de 3 aminoácidos, la secuencia codificadora para los 289 aminoácidos del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura, la secuencia codificadora para los 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2, un conector Ala Ala, la secuencia codificadora para el GM-CSF humano maduro (127 residuos), y la secuencia codificadora para glicina, alanina, cuatro prolina consecutivas, tres alaninas consecutivas y seis histidinas consecutivas.

La construcción ilustrativa HER500* (SEQ ID NO:8) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluye en la dirección 5' a 3': la secuencia codificadora para una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, la secuencia codificadora para una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, la secuencia codificadora para una secuencia señal de HER-2 de 3 aminoácidos, la secuencia codificadora para los 289 aminoácidos del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura, un conector Ala, la secuencia codificadora para el octapéptido inmunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), la secuencia codificadora para los 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2, tres alaninas consecutivas y seis histidinas consecutivas.

La construcción ilustrativa HER500*•rGM-CSF (SEQ ID NO:9) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluye en la dirección 5' a 3': la secuencia codificadora para una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, la secuencia codificadora para una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, la secuencia codificadora para una secuencia señal de Her-2 de 3 aminoácidos, la secuencia codificadora para los 289 aminoácidos del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura, un enlazador Ala, la secuencia codificadora para el octapéptido inmunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₅₄), la secuencia codificadora para los 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2, un conector Ala Ala, la secuencia codificadora para el GM-CSF de rata maduro (127 residuos), y la secuencia codificadora para glicina, alanina, cuatro prolina consecutivas, alanina, y seis histidinas consecutivas.

La construcción ilustrativa HER300*•rGM-CSF (SEQ ID NO:10) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluye en la dirección 5' a 3': la secuencia codificadora para una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, la secuencia codificadora para una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, la secuencia codificadora para una secuencia señal de HER-2 de 3 aminoácidos, la secuencia codificadora para los 289 aminoácidos del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura, un conector Ala, la secuencia codificadora para el octapéptido inmunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), un conector Ala, la secuencia codificadora para el GM-CSF de rata maduro (127 residuos), y la secuencia codificadora para glicina, alanina, cuatro prolina consecutivas, alanina, y seis histidinas consecutivas.

Los métodos para la producción de proteínas de fusión inmunoestimuladoras por unión química de una secuencia antigénica a una secuencia derivada del dominio intracelular de la proteína HER-2 incluyen métodos de acoplamiento convencionales conocidos en la técnica. En las construcciones que también incluyen una o más secuencias peptídicas añadidas, la unión química se consigue también usando métodos de acoplamiento convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, los péptidos pueden ser acoplados usando un agente deshidratante, tal como diciclohexilcarbodiimida (DCCI) para formar un enlace peptídico entre los dos péptidos. Alternativamente, las uniones pueden formarse a través de grupos sulfhidrilo, grupos épsilon-amino, grupos carboxilo u otros grupos reactivos presentes en los polipéptidos, usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce Co., Rockford, IL).

IV. Producción de proteínas de fusión recombinantes

La invención incluye proteínas de fusión inmunoestimuladoras producidas utilizando técnicas recombinantes. Dichas proteínas de fusión inmunoestimuladoras pueden ser producida por diversos métodos empleados habitualmente por los expertos en la técnica.

Salvo indicación contraria, todas las expresiones utilizadas en la presente memoria tienen el mismo significado que el aplicado por los expertos en la técnica correspondiente. Los profesionales acuden particularmente a Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Second Edition), Cold Spring Harbor Press, Plain-

view, N.Y. y Ausubel FM *et al.* (1989) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., para las definiciones y métodos utilizados habitualmente por los expertos en la técnica.

Las proteínas de fusión se puede producir cultivando células hospedantes procariotas o eucariotas recombinantes que contengan secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión en condiciones que promuevan la expresión de las proteínas de fusión, seguido de la recuperación de la proteína de fusión de las células hospedantes o del medio de cultivo celular.

El ácido nucleico que codifica la secuencia de una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención se inserta en uno cualquiera de una variedad de vectores de expresión para expresar un polipéptido, siempre que sea replicable y viable en el hospedante. En general, la secuencia codificadora del ácido nucleico se inserta en un sitio o sitios de endonucleasas de restricción apropiados utilizando técnicas habituales. Dichos procedimientos y procedimientos de sub-clonación correspondientes se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica. El vector puede comprender secuencias reguladoras, incluyendo por ejemplo, secuencias no codificadoras, tales como intrones y elementos de control, es decir, elementos promotores y terminadores o regiones no traducidas en 5' y/o 3', eficaces para la expresión de la secuencia codificadora en un hospedante adecuado y/o en un ambiente vector u hospedante en el que no se expresa normalmente la secuencia que codifica la proteína de fusión inmunoestimuladora, unida operativamente a la secuencia codificadora. Los expertos en la técnica conocen gran número de vectores y promotores adecuados que están disponibles comercialmente, ejemplos de los cuales se describen en Sambrook, *et al.*, (*supra*).

La presente invención se refiere también a células hospedantes que han sido manipuladas genéticamente para que contengan un vector eficaz para expresar una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención por técnicas recombinantes. Las células hospedantes son manipuladas genéticamente (es decir, transducidas, transformadas o transfectadas) con un vector apropiado que puede ser, por ejemplo, un vector de clonación o de expresión. El vector puede tomar la forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas habitualmente para la célula hospedante seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos en la técnica.

Los métodos para introducir ácidos nucleicos en células para la expresión de proteínas heterólogas son también conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos incluyen transfección mediante fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación, microinyección nuclear, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas y el uso de policones, por ejemplo, polibreno o poliornitina. Los aspectos generales de transformación que implican células de mamíferos han sido descritos en la Patente de EE.UU. No. 4.399.216 y Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990), incorporándose ambos expresamente como referencia en la presente memoria.

Células hospedantes adecuadas para clonación o expresión de una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención incluyen células procariotas, de levadura, de insectos y eucariotas superiores. Procariotas adecuadas incluyen aunque sin estar limitadas a ellas eubacterias, tales como organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *E. coli*.

Las células hospedantes adecuadas para la expresión de una proteína de fusión inmunoestimuladora glicosilada de la invención proceden de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos, tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, así como células vegetales. Ejemplos de líneas celulares hospedantes de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. La selección de la célula hospedante apropiada se considera dentro del alcance de la técnica.

Un procedimiento para producir dicha proteína de fusión inmunoestimuladora comprende cultivar células hospedantes en condiciones adecuadas para expresión de la proteína de fusión y recuperar la proteína de fusión del cultivo celular. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se puede encontrar en MAMMALIAN CELL BIOTECHNOLOGY: A PRACTICAL APPROACH, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*. Más específicamente, las técnicas para la expresión en el sistema de Baculovirus están descritas en Engelhard EK *et al. Proc. Nat. Acad. Sci.* 91:3224-3227, 1994, incorporada expresamente como referencia en la presente memoria.

Las células hospedantes transformadas con secuencias nucleotídicas que codifican una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención se pueden cultivar en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada a partir del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante se puede segregar, unir a una membrana o estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia particular y/o del vector utilizados.

Como entenderán los expertos en la técnica, un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención se puede diseñar con secuencias señales que dirijan la secreción de la proteína de fusión inmunoestimuladora a través de una membrana de células procariotas o eucariotas.

El ejemplo 1 detalla la construcción proteínas de fusión de HER-2 inmunoestimuladoras ilustrativas, el ácido nucleico y secuencias de aminoácidos deducidas de las representadas en la Tabla 2.

Se utilizaron vectores de expresión que comprenden la secuencia codificadora de diversas proteínas de fusión de HER-2 para transfectar las células 293-EBNA de mamíferos y las células SF21 de insectos. Una vez construidas, expresadas y purificadas, se analizaron las proteínas de fusión de HER2 que contienen bien GM-CSF de rata o GM-CSF humano para determinar las bioactividades de GM-CSF en pruebas apropiadas, empleadas habitualmente por los expertos en la técnica. Tanto las proteínas de fusión derivadas de células de mamíferos como de insectos presentaban actividad del GM-CSF, como se puso de manifiesto por su capacidad para mantener el crecimiento de la líneas celulares dependientes del GM-CSF. Igualmente, la presencia de HER-2 se verificó utilizando anticuerpos monoclonales específicos de HER-2 tanto por análisis por transferencia Western como por un ensayo ELISA, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Aunque la descripción anterior describe realizaciones particulares de la presente invención, se entenderá que los expertos en la técnica pueden sustituir la secuencia codificadora por diversos antígenos y pueden usar diferentes vectores y líneas celulares para la expresión, de acuerdo con métodos conocidos y de ese modo preparar composiciones de proteínas de fusión inmunoestimuladoras de acuerdo con los principios descritos en la presente memoria.

Tanto si son producidas por acoplamiento químico o por expresión de una secuencia codificadora continua como proteína de fusión recombinante, las DC se pueden exponer a una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención y ser presentadas por dichas DC en el contexto de MHC I, dando como resultado una respuesta inmunitaria celular a la proteína de fusión.

V. Generación de células dendríticas (DC) activadas

A. Aislamiento y caracterización de precursoras de DC y de DC

Las precursoras de células dendríticas humanas (precursoras de DC) se pueden obtener a partir de cualquiera de diversas fuentes incluyendo, aunque sin estar limitadas a ellas, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, médula ósea y órganos linfoides.

Las precursoras de DC aisladas y enriquecidas por cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica darán como resultado una población de precursoras de DC eficaces para llevar a cabo los métodos de la presente invención.

En una propuesta preferida, las precursoras de DC se obtienen a partir de sangre periférica. En esta propuesta, se recogen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos por leucaféresis estándar y se aíslan las precursoras de DC, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad flotante en una etapa o en dos etapas sucesivas utilizando la solución de densidad flotante BDS 77 o BDS 77 y 65, respectivamente (Dendreon Corp.), como se ha descrito en la solicitud de patente USSN 60/168991 (0021) de propiedad conjunta con la presente.

Las precursoras de DC se pueden obtener a partir de un sujeto sano o un sujeto que se sabe que sufre una enfermedad asociada a la expresión de un antígeno particular. Dichas precursoras de DC pueden ser alogénicas o autólogas.

Una vez obtenidas las precursoras de DC, se cultivan en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para expandir la población celular y mantener las DC en un estado para la absorción, procesamiento y presentación óptimos del antígeno.

En una propuesta preferida para cultivar las precursoras de DC, se generan las DC a partir de dichas precursoras de DC por cultivo *ex vivo* en un medio exento de suero o exento de proteínas durante 40 horas, en ausencia de citoquinas añadidas exógenamente, como se detalla en solicitud de patente USSN 60/158618 de propiedad conjunta con la presente. En resumen, las precursoras de DC se cultivan en bolsas de teflón (American Fluoroseal) a una densidad de 1×10^7 por ml en medio de cultivo Aim V complementado con glutamina 2mM en una incubadora humidificada a 37°C bajo CO_2 al 5% durante 40 horas. Durante el periodo de cultivo las precursoras de DC son pulsadas con Ag.

Los aspectos preferidos del aislamiento y cultivo de las DC incluyen el uso de un medio de cultivo que carece de citoquinas suministradas exógenamente y el cultivo en condiciones exentas de suero de manera eficaz para dar como resultado la generación de DC superactivadas cargadas de Ag.

La pureza de las DC en esta fracción se puede cuantificar utilizando, por ejemplo, análisis por citometría de flujo (es decir, FACS) para caracterización fenotípica como se describe en la solicitud de patente USSN 60/158618 de propiedad conjunta con la presente, junto con caracterización funcional. El análisis de los fenotipos de la superficie celular se realiza utilizando muestras que constan de aproximadamente $1-3 \times 10^7$ células, que se incuban en suero de ratón normal al 10% en PBS durante 10 minutos, se lavan en PBS y se vuelven a poner en suspensión en 250-750 μl de PBS. A continuación se distribuye la suspensión celular a 30 μl /pocillo en placas de 96 pocillos de fondo

redondo. Se añaden mAb conjugados con FITC, PE y PerCP a 10 µl/pocillo y se incuban las células durante 20 minutos en la oscuridad sobre hielo. A continuación se lavan las células con 200 µl/pocillo de PBS y se vuelven a poner en suspensión a 400 µl/pocillo en PBS, a continuación se analizaron por FACScan (Becton Dickinson) utilizando como control negativo células marcadas con Ab control de igual isotipo. Las características funcionales preferidas de las DC maduras incluyen la adquisición de capacidades aloestimuladoras y de presentación de Ag.

Las DC superactivadas y cargadas de Ag han procesado ya un Ag y tienen la capacidad de presentar el Ag a las células inmunitarias y generar rápidamente respuestas inmunitarias específicas del Ag, por ejemplo, respuestas de linfocitos T mediadas por CTL a antígenos tumorales.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, las DC pueden ser conservadas por crioconservación bien antes o después de la exposición a una proteína de fusión de HER-2 de la invención. Métodos ilustrativos de crioconservación son los descritos en la solicitud de patente USSN 60/168991 de propiedad conjunta con la presente. Para crioconservación a pequeña escala, las células se pueden volver a poner en suspensión a 20-200 x 10⁶/ml en seroalbúmina humana (HAS) al 5% enfriada previamente (Cruz Roja suiza). A continuación se añadió gota a gota un volumen igual de dimetilsulfóxido (DMSO) al 20% en la solución de HAS anterior. La mezcla se reparte alícuotamente en crioviales a 1 ml/vial y se congela a -80°C en una criocámara (Nalgene) durante una noche. Por la mañana los viales se transfieren a un depósito con nitrógeno líquido. Para la crioconservación a gran escala, las células se pueden volver poner en suspensión a 30-600 x 10⁶/ml en AIM V. A continuación se añade gradualmente un volumen igual de AIM V al 20%. La mezcla se congela en recipientes congeladores (Cryocyte, Baxter) a 20 ml/bolsa utilizando un sistema congelador controlado (Forma).

B. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas de fusión

Presentación del antígeno *in vitro*

Se puede realizar un ensayo de la presentación del antígeno para evaluar la capacidad de presentación del antígeno de varias proteínas de fusión inmunoestimuladoras. Un ensayo ilustrativo se describe en el Ejemplo 1, en el que el hibridoma B3Z de linfocitos T de ratón que segrega IL-2, que responde al MHC clase I de ratón (H2-K^b) unido al péptido SIINFEKL, derivado de OVA, (OVA₂₅₇₋₂₆₄; Jameson *et al.*, 1993, *J. Exp. Med.* 177: 1541), es estimulado con varias DC que han sido pulsadas previamente con proteínas de fusión de HER-2 manipuladas genéticamente y se evalúa la magnitud de respuesta midiendo la incorporación de [³H]timidina en células dependientes de IL-2 proliferantes.

El formato de ensayo descrito en la presente memoria se puede usar para evaluar la presentación del antígeno utilizando una valoración del antígeno junto con un número fijo de APC.

C. Ensayos *in vivo* en modelos animales

Una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención se puede evaluar *in vivo* en modelos animales. En tales casos, la pre-inmunización de animales con la composición de la proteína de fusión inmunoestimuladora o con la DC súper-activada tratada *ex vivo* con la composición es eficaz para suprimir *in vivo* el crecimiento de tumores o de un agente infeccioso.

En un ejemplo de esta propuesta, la pre-inmunización de ratones con DC activadas pulsadas *ex vivo* con la composición de la proteína de fusión de HER-2, HER500*•rGM-CSF (SEQ ID NO:4), que tiene un componente antigénico que consiste en 289 aminoácidos procedentes del dominio extracelular de HER2 fusionados con 217 aminoácidos procedentes del dominio intracelular de HER2, suprimía el crecimiento *in vivo* en ratones de tumores autólogos que expresan HER-2 (Ejemplo 2). En otra propuesta, se les inocula a animales, por ejemplo, ratones, un agente infeccioso o células formadoras de tumores particulares, a continuación se tratan con una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención y se evalúan para determinar la capacidad de la composición antigénica para suprimir *in vivo* el desarrollo del agente infeccioso o de un tumor establecido.

El ejemplo 3 ilustra esta propuesta, en la que la inyección posterior a la infección de ratones con DC activadas pulsadas *ex vivo* con las composiciones de la proteína de fusión de HER-2, HER500*•rGM-CSF (SEQ ID NO:4), HER500•hGM-CSF (SEQ ID NO:2), HER500* (SEQ ID NO:3) y HER500 (SEQ ID NO:1), aumentó el tiempo de supervivencia de los ratones previamente inoculados con células tumorales autólogas que expresan HER-2.

Los resultados de los estudios en animales confirman que para generar una respuesta antitumoral eficaz, una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención debe comprender un componente de secuencia antigénica y un componente de secuencia derivado del dominio intracelular de HER-2.

VI. Composiciones y métodos para inmunoterapia y oncoterapia

La presente invención proporciona composiciones de proteínas de fusión inmunoestimuladoras que son capaces de presentar eficazmente un antígeno para la inducción de respuestas proliferantes tanto mediadas por los CTL del tipo CD8⁺ como por linfocitos Th del tipo CD4⁺.

En este sentido, las composiciones de proteínas de fusión inmunoestimuladoras de la presente invención son universalmente útiles y se pueden emplear en una amplia gama de aplicaciones inmunoterapéuticas, inmunoprolácticas y oncoterapéuticas que implican la generación de respuestas inmunitarias primarias y secundarias.

5 La invención proporciona también antígenos polipeptídicos o proteínicos solubles modificados presentados en el contexto del MHC Clase I.

En una realización preferida, la inmunización con un antígeno proteínico soluble modificado de la invención da como resultado una respuesta inmunitaria celular mediada por MHC Clase I a un antígeno que no provocaría una respuesta inmunitaria celular de la misma magnitud que si se proporciona en una forma no modificada.

10 La inmunización con dicho antígeno proteínico soluble modificado da como resultado una respuesta inmunitaria celular mediada por MHC Clase I de mayor magnitud y por consiguiente proporciona mayor protección que una respuesta inmunitaria celular al mismo antígeno si se proporciona en una forma no modificada.

15 En una realización preferida, la invención proporciona una composición inmunoestimuladora que comprende DC expuestas *ex vivo* a una proteína de fusión inmunoestimuladora que comprende un componente de secuencia de antígeno polipeptídico y un componente de secuencia derivado del dominio intracelular de la proteína HER-2, como se ha descrito antes, que es capaz de inducir más eficazmente respuestas a linfocitos T, que una composición que comprende el antígeno polipeptídico solo.

Una composición inmunoestimuladora que comprende DC expuestas *ex vivo* a una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención sola o en combinación con la proteína de fusión inmunoestimuladora tiene utilidad en inmunoterapia de un sujeto y puede actuar como una vacuna.

20 En un aspecto relacionado, la invención incluye un método para inmunizar un sujeto frente a un antígeno polipeptídico asociado con un tipo particular de cáncer o enfermedad infecciosa. El método incluye exponer o pulsar una DC con una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras, como se describe con más detalle a continuación.

25 Al realizar los métodos de la invención, la etapa de exposición se puede realizar *in vitro* (*ex vivo*), *in vivo* o tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención se puede inyectar directamente en un sujeto o la DC se puede exponer *in vitro* a la proteína de fusión inmunoestimuladora de una manera eficaz para inducir la presentación de la superficie celular del componente antigénico de la proteína de fusión y la DC pulsada devolverla al sujeto.

30 Una composición antigénica que comprende una proteína de fusión inmunoestimuladora sola o en combinación con la DC estimulada por exposición *in vitro* a la proteína de fusión inmunoestimuladora se puede usar, por ejemplo, en administración directa *in vivo*, terapia somática *ex vivo*, dispositivos implantables *in vivo* o en dispositivos extracorpóreos *ex vivo*.

35 Se entenderá que se pueden utilizar cualquiera de los diversos métodos para pulsar las DC con una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención, para hacer que sean eficaces en la presentación del antígeno en el contexto del MHC I. Los experimentos detallados en la presente memoria demuestran que la activación de las DC por exposición a proteínas de fusión inmunoestimuladoras facilita el procesamiento del componente antigénico de la proteína de fusión a través de la ruta "endógena" de la clase I, de tal forma que los antígenos estén presentados asociados con las moléculas de MHC de la clase I y por consiguiente sea capaces de activar los CTL del tipo CD8⁺.

40 De lo anterior se apreciará que la invención proporciona composiciones y métodos que tienen la única misión de que el procesamiento de antígenos proteínicos solubles tenga lugar a través de la ruta de la clase I del MHC, en oposición a la ruta de la clase II.

VII. Aplicaciones terapéuticas

A. Exposición *ex vivo* de DC a composiciones de proteínas de fusión inmunoestimuladoras

45 La invención se basa en el descubrimiento de que las DC pueden ser expuestas a una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras, bien *in vitro* (*ex vivo*) o *in vivo* en un sujeto, dando como resultado una respuesta protectora mediada por linfocitos T contra el componente antigénico de la proteína de fusión.

50 Las DC se tratan *in vitro* (*ex vivo*) con una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras, seguido de la administración a un sujeto. El sujeto puede ser el mismo individuo del que se obtuvieron las DC (trasplante autólogo) o un individuo diferente (trasplante alogénico). En el trasplante alogénico, el donante y el receptor deben ser equivalentes en cuanto a la similitud de los antígenos HLA con el fin de minimizar la respuesta inmunitaria tanto de las células del donante contra las del receptor como a la inversa.

Un sujeto puede tratarse con una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladora de la invención sola o en combinación con un régimen terapéutico utilizado para el estado en tratamiento, por ejemplo radioterapia y/o quimioterapia para el tratamiento del cáncer.

5 En general, se obtienen precursoras de DC, se cultivan en condiciones exentas de suero en un medio que carece de citoquinas suministradas exógenamente, como se ha descrito antes, seguido de exposición *in vitro* (*ex vivo*) de las DC a una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras de la invención seguido de reperfusión de las DC activadas en el sujeto.

10 La reperfusión *ex vivo* de DC tratadas con una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras proporciona un medio para la generación rápida de una respuesta inmunitaria al componente antigénico de la proteína de fusión.

B. Administración *in vivo* de una composición de una proteína de fusión inmunoestimuladora

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para tratar un sujeto por administración *in vivo* de una composición de una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención.

15 En una realización, el sujeto tiene un tipo de cáncer que expresa un antígeno específico del tumor. De acuerdo con la presente invención, se puede preparar una proteína de fusión inmunoestimuladora que comprende un componente de secuencia del antígeno específico del tumor y un componente de una secuencia derivada del dominio intracelular de HER-2. En tales casos, se administran DC pulsadas *ex vivo* con esta proteína de fusión inmunoestimuladora a un sujeto, sola o en combinación con la proteína de fusión, dando un mejor resultado terapéutico para el sujeto, evidenciado por, por ejemplo, una ralentización o disminución del crecimiento de las células cancerígenas o de un tumor sólido que expresa el antígeno específico del tumor, o una reducción del número total de células cancerígenas o de la carga tumoral total.

20 En una realización relacionada, al sujeto se le diagnosticó una infección viral, bacteriana, fúngica o cualquier otro tipo, que está asociada con la expresión de un antígeno particular, por ejemplo, un antígeno viral. De acuerdo con la presente invención, se puede preparar una proteína de fusión inmunoestimuladora que comprende una componente de secuencia que consiste en el antígeno, por ejemplo, un antígeno específico de HBV, junto con un componente de secuencia derivada del dominio intracelular de HER-2. En tales casos, se administran DC pulsadas *ex vivo* con la proteína de fusión inmunoestimuladora a un sujeto, solas o en combinación con la proteína de fusión, dando un mejor resultado terapéutico para el sujeto como se evidencia por una ralentización del crecimiento del agente infeccioso causante en el sujeto y/o una disminución o eliminación de síntomas detectables asociados típicamente a la enfermedad infecciosa particular.

25 En cualquier caso, la administración *in vivo* de una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención a un sujeto proporciona un medio para generar una respuesta inmunitaria protectora mediada por linfocitos T e inducida por DC al antígeno en el sujeto, dependiendo de (1) la composición antigénica administrada, (2) la duración, dosis y frecuencia de administración y (2) el estado general del sujeto.

35 En un ejemplo, el sujeto tiene un cáncer que expresa HER-2 y la administración de una composición de la proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención que incluye HER2 como el componente antigénico de la proteína de fusión proporciona un medio para mejorar el resultado terapéutico del sujeto. En esta realización, la composición de HER-2 inmunoestimuladora se administra al sujeto de manera eficaz dando como resultado una respuesta inmunitaria celular a las células cancerígenas que expresan HER-2 en el sujeto.

C. Tratamiento de pacientes

La administración eficaz de la composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras es un aspecto importante de la invención. De acuerdo con la invención, dichas vías de administración incluyen, aunque sin estar limitadas a ellas, diversas vías sistémicas, incluyendo vías parenterales, por ejemplo, inyección intravenosa (IV), subcutánea (SC), intraperitoneal (IP) e intramuscular (IM).

45 Se apreciará que también se consideran métodos eficaces para administrar una proteína de fusión inmunoestimuladora a células dendríticas o para introducir una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras o de DC en la proximidad inmediata de las células que expresan el antígeno.

50 En una realización preferida, la composición inmunoestimuladora es una proteína de fusión, contenida en un vehículo farmacéuticamente aceptable y administrada por vía intravenosa. En un aspecto adicional de esta realización, la composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras se administra a intervalos regulares durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, a intervalos quincenales durante dos meses o menos. Sin embargo, en algunos casos la composición de proteínas de fusión se administra intermitentemente durante un periodo de tiempo más largo.

Típicamente, se administra una o más dosis de la proteína de fusión inmunoestimuladora, generalmente a intervalos quincenales durante un periodo de aproximadamente dos meses. Las dosis preferidas para administración por vía IV, SC o IM son de aproximadamente 5 µg/kg por paciente a aproximadamente 5 mg/kg por paciente.

5 En otra realización preferida, la composición inmunoestimuladora comprende DC expuestas *ex vivo* a una proteína de fusión inmunoestimuladora, contenida en un vehículo farmacéuticamente aceptable y administrada por vía IV, SC o IM.

10 En un aspecto de esta realización, la composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras comprende de 10^7 a 10^{11} DC, que han sido expuestas a 100 ng/ml hasta 1 mg/ml de una proteína de fusión inmunoestimuladora dada, de manera eficaz para generar DC cargadas de Ag como se describe en los Ejemplos 2 y 3. A continuación se administran dosis de aproximadamente 10^7 a 10^{11} DC al sujeto por inyección intravenosa o SC o IM de acuerdo con los procedimientos establecidos durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, a intervalos quincenales durante 2 meses o menos. Sin embargo, en algunos casos la composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras se administra intermitentemente durante un periodo de tiempo más largo.

15 Típicamente, una o más dosis de la composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras se administra, generalmente a intervalos regulares durante un periodo de aproximadamente 2 meses. En general, el método comprende administrar a un sujeto, en un vehículo farmacéutico adecuado, una cantidad de una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras o de DC eficaz para dar un mejor resultado terapéutico para el sujeto en tratamiento.

20 Se deduce que la composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras o de DC se puede administrar en cualquier vehículo conveniente, que sea fisiológicamente aceptable. Dicha composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras o de DC puede incluir cualquiera de una variedad de vehículos estándares fisiológicamente aceptables empleados por los expertos en la técnica. Ejemplos de dichos vehículos farmacéuticos incluyen, aunque sin estar limitados a ellas, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), agua y solución de Ringer. Ha de entenderse que la elección del vehículo fisiológicamente aceptable adecuado variará dependiendo del modo de administración elegido.

25 Las composiciones de liberación prolongada también se consideran dentro del alcance de esta solicitud. Dichas composiciones pueden incluir matrices polímeras semipermeables en forma de artículos conformados, tales como películas o microcápsulas.

30 En aplicaciones preferidas del método, el sujeto es un ser humano. El sujeto puede ser también un paciente con cáncer, en particular un paciente al que se le ha diagnosticado un cáncer que expresa un antígeno particular específico del cáncer o asociado con dicho cáncer y el paciente puede estar o no con un tratamiento de quimioterapia o radioterapia.

35 Ha de entenderse que la dosis *in vivo* eficaz de una composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras o de DC de la invención variará de acuerdo con la frecuencia y vía de administración así como con el estado del sujeto en tratamiento. Por consiguiente, dicha terapia *in vivo* requerirá generalmente ser controlada por ensayos apropiados al estado que ha de tratarse y un ajuste correspondiente de la dosis o régimen de tratamiento con el fin de conseguir un resultado terapéutico óptimo.

D. Tratamiento con monitorización

40 La eficacia de un régimen terapéutico dado que implica los métodos descritos en la presente memoria, se puede monitorizar, por ejemplo, monitorizando la inducción de una respuesta de CTL, una respuesta de linfocitos T colaboradores y/o la respuesta de anticuerpos al componente antigénico de la proteína de fusión en la sangre periférica utilizando métodos bien conocidos en la técnica además de controlar el estado del cáncer y el estado biológico del sujeto, en diversos momentos después de la administración.

45 En los casos en los que al sujeto se le ha diagnosticado un tipo de cáncer particular, también se monitoriza el estado del cáncer utilizando técnicas de diagnóstico apropiadas al tipo de cáncer en tratamiento. Igualmente, en los casos en los que al sujetos se le ha diagnosticado un tipo de infección particular, también se monitoriza el estado de la infección utilizando técnicas de diagnóstico apropiadas al tipo de infección en tratamiento.

El régimen de tratamiento con la composición de proteínas de fusión inmunoestimuladoras o de DC se puede ajustar (dosis, frecuencia, vía, etc.), según se indique, basándose en el estado del sujeto en tratamiento y los resultados de los análisis antes descritos.

50 VIII. Utilidad

La presente invención proporciona composiciones de proteínas de fusión inmunoestimuladoras que son capaces de presentar eficazmente el antígeno para la inducción de respuestas proliferantes tanto mediadas por los CTL del tipo CD8⁺ como por linfocitos Th del tipo CD4⁺.

En este sentido, las composiciones de proteínas de fusión inmunoestimuladoras de la invención son universalmente útiles y se pueden emplear en una amplia gama de aplicaciones inmunoterapéuticas, inmunoprolácticas y oncoté-
rapéuticas que implican la generación de respuestas inmunitarias primarias y secundarias.

5 Las composiciones de proteínas de fusión inmunoestimuladoras de la invención encuentran utilidad en la inmunote-
rapia de cánceres que están asociados a la expresión de un antígeno particular. Por ejemplo, las composiciones de
proteínas de fusión de HER-2 descritas en la presente memoria encuentran utilidad en inmunoterapia de tumores
que expresan la HER-2, tales como, carcinoma de mama, cáncer de ovario y cáncer de colon.

10 Las ventajas de la presente invención incluyen la inducción de inmunidad celular potenciada a antígenos polipeptídi-
cos o proteínicos solubles o aislados presentando una proteína de fusión inmunoestimuladora de la invención a una
célula dendrítica (DC), dando como resultado la activación de la DC. Como se ha descrito antes, dicha inducción no
se suele observar utilizando antígenos polipeptídicos o proteínicos solubles como materiales de inducción. La gene-
ración de dichas DC activadas, se puede realizar *in vitro* (*ex vivo*) utilizando DC autólogas o alogénicas o puede
tener lugar *in vivo* después de la administración a un sujeto de una proteína de fusión inmunoestimuladora de la
invención.

15 Los siguientes ejemplos ilustran la invención aunque sin limitarla de ningún modo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de proteína de fusión de HER-2 ilustrativa

20 En un ejemplo, se clonó HER-2 humana a partir de una línea celular SK-BR3, de acuerdo con métodos conocidos en
la técnica. El codón de parada en el extremo 3' de la secuencia se eliminó por mutación y en su lugar se insertó un
sitio Not I para fusionar el cDNA de la HER-2 al péptido de etiqueta en el extremo terminal C, GM-CSF de rata o
DNA de GM-CSF humano. El DNA de GM-CSF se clonó a partir de una genoteca de PBMC de acuerdo con méto-
dos estándares. Se insertó un sitio Not I en el extremo 5' del DNA y se insertó un sitio de clonación Xba I en el ex-
tremo 3' junto con un codón de parada en marco. Los cDNA generados por PCR se hidrolizaron con enzimas de
25 restricción apropiadas y se clonaron en vectores de restricción para transfección en líneas celulares de mamíferos o
insectos.

30 Se utilizaron vectores de expresión que comprenden la secuencia codificadora de diversas proteínas de fusión de
HER-2 para transfectar células 293-EBNA de mamífero (Invitrogen) (expresión transitoria) y células SF21 de inse-
ctos (Clontech, Palo Alto, CA). Se recuperaron productos de proteínas de fusión de los líquidos sobrenadantes del
cultivo tisular y se purificaron por afinidad haciéndolos pasar por una columna de afinidad a metales (resina NTA,
Qiagen). Para HER500-hGM-CSF, el análisis por SDS-PAGE reveló bandas de proteínas que migraban a 120 kDa y
110 kDa como productos procedentes de células de mamíferos e insectos, respectivamente. El tamaño predicho de
la cadena principal del polipéptido de 690 aminoácidos es 74877 Da.

35 Las proteínas procedentes de HER-2 humana se produjeron como proteínas recombinantes utilizando las siguientes
secuencias codificadoras.

40 La construcción HER500**r*GM-CSF (SEQ ID NO: 4) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que
incluía, en la dirección 5' a 3': un péptido señal de PAP de 32 aminoácidos, una secuencia de 3 aminoácidos de la
proteína PAP madura, un conector Ala Arg, una secuencia señal de 3 aminoácidos de HER-2, 289 aminoácidos del
dominio extracelular distal de membrana de la HER-2 madura, un conector Ala, el octapéptido inmunodominante
derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2,
un conector Ala Ala, una secuencia de 127 aminoácido del GM-CSF de rata maduro y Gly Ala Pro Pro Pro Ala
His His His His His His.

45 La construcción HER300**r*GM-CSF (SEQ ID NO: 5) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que
incluía, en la dirección 5' a 3': una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, una secuencia de 3 aminoácidos de
la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, una secuencia señal de 3 aminoácidos de HER-2, 289 aminoácidos
del dominio extracelular distal de membrana de la HER-2 madura, un conector Ala, el octapéptido inmunodominante
derivado de OVA; SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), un conector Ala, una secuencia de 127 aminoácido de GM-CSF de rata
maduro y Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala His His His His His His.

50 Se utilizaron vectores de expresión de baculovirus BP8 (Clontech) que comprendían la secuencia codificadora de las
proteínas de fusión HER500**r*GM-CSF (SEQ ID NO: 9) o HER300**r*GM-CSF (SEQ ID NO: 10) para transfectar
células SF21. Se recuperaron productos de proteínas de fusión de los líquidos sobrenadante del cultivo de tejidos y
se purificaron por afinidad mediante cromatografía de afinidad a metales. El análisis por SDS-PAGE reveló bandas
de proteínas que migraban a 105 kDa para HER500**r*GM-CSF y a 60 kDa para HER300**r*GM-CSF.

Una vez construidas, expresadas y purificadas, se analizaron las moléculas de fusión de HER-2 que contenían GM-CSF de rata o GM-CSF humano para determinar la bioactividad apropiada del GM-CSF y se verificó la presencia de HER-2 utilizando anticuerpos monoclonales específicos de HER-2 por análisis de transferencia Western y por ELISA, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

5 Evaluación de la presentación *in vitro* de las proteínas de fusión de HER-2

Se utilizó el hibridoma B3Z de linfocitos T de ratón que segrega IL-2, que responde al péptido derivado de OVA unido a MHC clase I (H2-K^b) de ratón SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄; Jameson *et al.*, 1993, *J. Exp. Med.* 177: 1541) para evaluar la capacidad de presentación de antígenos de las proteínas de fusión de HER-2 que contenían el péptido inmunodominante derivado de OVA SIINFEKL.

10 Los cultivos de tejidos se mantuvieron en medio IMDM complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, 0,1 mg/ml de sulfato de kanamicina y 2-ME 3×10^{-5} M (Gibco, Grand Island, NY) a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5% (incubadora de cultivo de tejidos).

15 Se obtuvieron preparaciones enriquecidas en DC activadas incubando células de bazo C57BL/6 autólogas en matrices con cultivo de tejidos durante 2 h a 37°C, eliminando las células no adherentes y cultivando las células adherentes restantes durante 2 días con ionomicina 1 µM.

20 Se realizó un análisis de la secreción de IL-2 como se ha descrito anteriormente [Kruisbeek, 1998, en Coligan *et al.* (eds.) *Current Protocols in Immunology*, Wiley, New York, NY, 1:3.14]. Más específicamente, se cultivaron 10⁵ células de hibridoma en micropocillos de 0,2 ml en presencia de 3×10^4 DC activadas y diversas concentraciones de antígenos HER-2. Un día más tarde, se recogieron los líquidos sobrenadantes y se analizaron a una concentración del 50% para determinar su capacidad para mantener la proliferación de 10⁴ células HT-2 (una línea celular dependiente de IL-2) durante 24 h, medida por incorporación de [³H]timidina durante el periodo final de cultivo de 6 h.

25 Se evaluó *in vitro* la respuesta de las células B3Z a las proteínas de fusión HER300*•rGM-CSF y HER500*•rGM-CSF relativas a OVA (Grado VII, ovalbúmina de pollo con 99% de pureza adquirida a Sigma, St. Louis, MO). La respuesta proliferante celular indicada como CPM basada en la absorción de [³H]timidina (Fig. 1) indica que las proteínas de fusión HER300*•rGM-CSF y HER500*•rGM-CSF son más eficaces para estimular B3Z que la OVA propiamente dicha (aproximadamente, 10 veces y > 100 veces, respectivamente). La superioridad de 10 veces de HER500*•rGM-CSF sobre HER300*•rGM-CSF indica que la presentación potenciada de Ag está relacionada con la inclusión del dominio intracelular adicional de HER-2 derivado de 217 aminoácidos en la proteína de fusión (que están presentes en HER500*•rGM-CSF pero ausente en HER300*•rGM-CSF).

30 Ejemplo 2

Prevención del crecimiento tumoral *in vivo* por pre-inmunización con DC pulsadas por Ag

Se evaluó el efecto de la pre-inmunización con DC activadas pulsadas por HER-2 sobre la supresión del crecimiento *in vivo* de tumores autólogos que expresan HER-2 en un modelo de muridos.

35 Se generó la línea de células tumorales de ratón E.HER-2 transfectando células EL-4 (timoma derivado de cepas de ratón C57BL/6; ATCC, Rockville, MD) con el cDNA de longitud completa de HER-2 humana de acuerdo con métodos estándares.

Las proteínas derivadas de HER-2 humana se produjeron como proteínas recombinantes como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, utilizando las siguientes secuencias codificadoras.

40 La construcción HER500 (SEQ ID NO: 1) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluía, en la dirección 5' a 3': una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, 3 aminoácidos de una secuencia señal de HER-2, 289 aminoácidos de dominio extracelular distal de membrana de HER-2, 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2 y una etiqueta en el extremo terminal C que consistía en Ala Ala Ala His His His His His.

45 La proteína HER-2HER500•hGM-CSF (SEQ ID NO: 2) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluía, en la dirección 5' a 3': una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, 3 aminoácidos de la secuencia señal HER-2, 289 aminoácidos de dominio extracelular distal de membrana de HER-2, 217 aminoácidos de dominio intracelular distal de membrana de HER-2, un conector Ala Ala, una secuencia de 127 aminoácido del GM-CSF humana madura y una etiqueta en el extremo terminal C que consistía en Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala His His His His His.

50 La construcción HER500* (SEQ ID NO: 3) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluía, en la dirección 5' a 3': una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, 3 aminoácidos de la secuencia señal de HER-2, 289 aminoácidos de dominio extracelular distal de membrana de HER-2, un conector Ala, el octapéptido inmunodominante derivado de OVA,

SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), 217 aminoácidos de dominio intracelular distal de membrana de HER-2 y una etiqueta en el extremo terminal C que consistía en Ala Ala Ala His His His His His His.

La construcción HER500**r*GM-CSF (SEQ ID NO: 4) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluía, en la dirección 5' a 3': una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, 3 aminoácidos de una secuencia señal de HER-2, 289 aminoácidos de dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura, un conector Ala, el octapéptido inmunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), 217 aminoácidos de dominio intracelular distal de membrana de HER-2, un conector Ala Ala, una secuencia de 127 aminoácidos del GM-CSF de rata maduro y una etiqueta en el extremo terminal C que consistía en Gly Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala His His His His His His.

La construcción HER300**r*GM-CSF (SEQ ID NO: 5) se produjo por expresión de una secuencia codificadora que incluía, en la dirección 5' a 3': una secuencia señal de PAP de 32 aminoácidos, una secuencia de 3 aminoácidos de la proteína PAP madura, un conector Ala Arg, 3 aminoácidos de la secuencia señal de HER-2, 289 aminoácidos de dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura, un conector Ala, el octapéptido inmunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), un conector Ala, una secuencia de 127 aminoácidos de GM-CSF de rata maduro y una etiqueta en el extremo terminal C que consistía en Gly Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala His His His His His His.

A ratones C57BL/6 hembras, elegidos al azar, de ocho semanas se les administraron 3 inyecciones IP de $2,5 \times 10^5$ de DC activadas pulsadas con Ag en 0,1 ml de PBS a intervalos de 2 semanas. Se obtuvieron preparaciones enriquecidas de DC activadas incubando células de bazo de ratones C57BL/6 hembras en matraces con cultivo de tejidos durante 2 h a 37°C, retirando las células no adherentes y cultivando posteriormente las células adherentes restantes durante 2 días en presencia de ionomicina 1 μ M (Sigma, St. Louis, MO; Czerniecki *et al.*, 1997, *J. Immunol.* 159: 3823; Ridge *et al.*, 1998, *Nature* 393: 474). Las DC obtenidas de esta manera se pulsaron por cultivo conjunto durante 16 h con cada una de las proteínas de fusión de HER-2 indicadas a 1 μ M, se lavaron dos veces y se inyectaron a ratones. Dos semanas después de la última inmunización *in vivo*, los ratones se sometieron a una prueba de virulencia con una inyección IP de 5×10^5 células de E.HER-2 en 0,1 ml de PBS. Los ratones se vigilaron diariamente y se registró su supervivencia. En las Figuras 2A y 2B, respectivamente, se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

Aunque la inmunización con DC pulsadas con HER500**r*GM-CSF evitó el crecimiento del tumor, el tratamiento con HER300**r*GM-CSF no tuvo ningún efecto (Fig. 2A). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos *in vitro* confirmando la importancia del segmento del dominio intracelular de HER-2 para conseguir un alto nivel de presentación de Ag con el fin de generar una respuesta anti-tumoral eficaz. Los resultados experimentales mostrados en la Fig. 2B demuestran que también puede generarse un nivel significativo de protección *in vivo* frente a un tumor que expresa HER-2 (a) cuando inmunógenos que contienen HER500 se fusionan con GM-CSF humano (HER500**h*GM-CSF), (b) en ausencia de cualquier GM-CSF cuando tanto una porción intracelular como extracelular del antígeno HER-2 es enviada de nuevo a la construcción (HER500 y HER500*) y (c) en ausencia del péptido derivado de OVA SIINFEKL (HER500 y HER500**h*GM-CSF).

Ejemplo 3

Supresión *in vivo* de un tumor establecido por inmunización con DC activadas pulsadas con Ag

La eficacia de la inmunoterapia con diferentes proteínas de fusión de HER-2 se evaluó además por administración de las proteínas de fusión de HER-2 a ratones de laboratorio portadores de tumores (es decir, animales a los que se les había inyectado previamente células tumorales que expresan HER-2). A ratones de doce semanas se les inyectó IP 5×10^5 células de E.HER-2 en 0,1 ml de PBS el día 0, seguido por 2 inyecciones IP de $2,5 \times 10^5$ de DC activadas pulsadas por Ag en 0,1 ml de PBS (preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 2) un día y 12 días más tarde, respectivamente. Los ratones se vigilaron diariamente y se registró su supervivencia. Como se muestra en la Fig. 3, el tratamiento con DC pulsadas con las construcciones antigénicas que contenían HER500 (HER500**r*GM-CSF, HER500 y HER500**h*GM-CSF), presentaron un efecto terapéutico notable, prolongando considerablemente la supervivencia de los ratones portadores de tumores.

Descripción	SEQ ID NO
Secuencia de aminoácidos de HER500: MRAAPLLLARAASLSLGFLFLLFFWLDRSVLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHL YQG CQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEE APRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQ PDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTILSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQPHPPPAFSP AFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPAAAHHHHHHH	1
Secuencia de aminoácidos de HER500-hGM-GSF: MRAAPLLLARAASLSLGFLFLLFFWLDRSVLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHL YQG CQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEE APRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQ PDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTILSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQPHPPPAFSP AFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPAAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDT AAEMNETVEVISEMFDLQEPCLQTRLELYKQGLRSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQITFESF KENLKDFFLLVIPFDCWEPVQEGAPPPPAHHHHHHH	2
Secuencia de aminoácidos de HER500*: MRAAPLLLARAASLSLGFLFLLFFWLDRSVLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHL YQG CQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSASINFEKLGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTL GLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSP QPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTILSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQ HPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPAAAHHHHHHH	3

Secuencia de aminoácidos de HER500*-rGM-CSF: MRAAPLLLARAASLSLGFLLFFWLDRLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHL YQG CQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSASIINFELKAGGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTL GLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPHTDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSP QPEYVNQPDVVRQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTQGGGAAPQP HPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPAAPTRSPNPVTRPWKHVDAIKEALS LLNDMRALENEKNEDVDIISNEFSIQRPCTCVQTRLKLYKQGLRGNLTKLNGALTMIA SHYQTNCPPTPETDCEI EVTTTFEDFIKNLKGFLFDIPFDCWKPVQKGAPPPPAHHHHHH	4
Secuencia de aminoácidos de HER300*-rGM-CSF: MRAAPLLLARAASLSLGFLLFFWLDRLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHL YQG CQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSASIINFELKAGGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTL GLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPHTDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSP QPEYVNQPDVVRQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTQGGGAAPQP HPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPAAPTRSPNPVTRPWKHVDAIKEALS LLNDMRALENEKNEDVDIISNEFSIQRPCTCVQTRLKLYKQGLRGNLTKLNGALTMIA SHYQTNCPPTPETDCEI EVTTTFEDFIKNLKGFLFDIPFDCWKPVQKGAPPPPAHHHHHH	5
Secuencia codificadora nucleotídica de HER500: ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTCTTCTGCTTTTTT CTGGCTAGACCGAAGTGTAAGCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCGCGCTCGACCCAAGTGTCACCGG CACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCA GGGCTGCCAGGTGGTGACGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGCTCCTCTCTG CAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAAACCAAGTGAGGCAGGTCCCAGCAG AGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGA GACCCGCTGAACAATACCAACCCCTGTCAAGGGGCTCCCCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGA AGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACG ATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTC GGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCA GAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCGCACTGCCCACTGACTGCTGC CATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACC ACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCACTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCC CAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACG GACGTGGGATCGGGCGCTGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGT GGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAA GGGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGCAGCCAAGGGGCTGCAAGGCCTCCCC ACACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGAT GGCTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACAGCCAGATGTTCCGGCCCCAGC CCCCCTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCCGACCTGCTGGTGCCACTCTGGAAAGGGCCAAGAC TCTCTCCCCAGGGAAGAATGGGGTCGTCAAAGACGTTTTTGCCCTTTGGGGGTGCCGTGGAGAACCCGAG TACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCCCTCCTCTGCCTTACAGCCAGCCTTCGACA ACCTCTATTACTGGGACAGGACCCACAGAGCGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCTA CGGCAGAGAACCCAGGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGCGGCCGCACATCACCATCACCATCAC	6

Secuencia codificadora nucleotídica de HER500-hGM-CSF: ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTCTTCTGCTTTTTTT CTGGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCGCGTCGACCCAAGTGTGCACCGG CACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCA GGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCTGTCTTCCTG CAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAG AGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGA GACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGGCTCCCGAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGA AGCCTCACAGAGATCTTGAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAAGCTCTGCTACCAGGACACG ATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTC GGGCTGCCACCCCTGTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCA GAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCCTGCAAGGGGCCACTGCCACTGACTGCTGC CATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACC ACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCACTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCC CAATCCCGAGGGCCGGTATACATTGGCGGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACG GACGTGGGATCGGGCGCTGGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGT GGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGGCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAA GGGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGCAGCCAAGGGGCTGCAAAGCCTCCCC ACACATGACCCCAACCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGAGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGAT GGCTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACAGCCAGATGTTTCGGCCCCAGC CCCCCTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCCGACCTGCTGGTGCCACTCTGGAAGGGCCAAGAC TCTCTCCCCAGGGAAGAATGGGGTCTGTCAAAGACGTTTTTGCCTTTGGGGGTGCCGTGGAGAACCCCGAG TACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCCCTACGCCCCACCTCCTCCTGCCTTCAGCCCAGCCTTCGACA ACCTCTATTACTGGGACCAGGACCCACCAGAGCGGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCTA CGGCAGAGAACCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGCGGCCGACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCCA GCACACAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACA CTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCT ACAGACCCGCCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCCCTTGAC CATGATGGCCAGCCACTACAAACAGCACTGCCCTCCAACCCGGAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATC ACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTCTATCCCCCTTGACTGCTGGGAGCCAG TCCAGGAGGGCGCGCCACCCCGCCGGCGGCCGACATCACCATCACCATCAC	7
Secuencia codificadora nucleotídica de HER500*: ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTCTTCTGCTTTTTTT CTGGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCGCGTCGACCCAAGTGTGCACCGG CACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCA GGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCTGTCTTCCTG CAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAG AGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGA GACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGGCTCCCGAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGA AGCCTCACAGAGATCTTGAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAAGCTCTGCTACCAGGACACG ATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTC GGGCTGCCACCCCTGTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCA GAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCCTGCAAGGGGCCACTGCCACTGACTGCTGC CATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACC ACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCACTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCC CAATCCCGAGGGCCGGTATACATTGGCGGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACG GACGTGGGATCCGCTAGCATCATTAAATTCGAGAAGTTGGGCGCTGGGGGCATGGTCCACCACAGGCAC CGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGTGGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCC CCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAAGGGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGG CAGCCAAGGGGCTGCAAAGCCTCCCCACACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCCA CAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGATGGCTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCCAGCCTGAATATGT GAACGAGCCAGATGTTTCGGCCCCAGCCCCCTTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCCGACCTGCT GGTGCCACTCTGAAAGGGCCAAGACTCTCTCCCAGGGAAGAATGGGGTCTGTCAAAGACGTTTTTGCC TTTGGGGGTGCCGTGGAGAACCCCGAGTACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCT CCTCCTGCCTTCAGCCCAGCCTTCGACAACCTCTATTACTGGGACCAGGACCCACCAGAGCGGGGGGCTC CACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCTACGGCAGAGAACCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGCGG CCGCACATCACCATCACCATCAC	8

Secuencia codificadora nucleotídica de HER500*-rGM-CSF: ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTCTTCTGCTTTT TTTCTGGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCGCGTCGACCCAAGTGTGC ACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACC TCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCT GTCCTTCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAG GTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACATATGCCCTGGCCG TGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGGCTCCCCAGGAGGCCTGCG GGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAG CTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACAC TGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGG GGAGAGAGTTCTGAGGATTGTGAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCA AGGGGCCACTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTC TGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCA CCTACAACACAGACACGTTTGTAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCCGCCCCAGCTG TGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCGCTAGCATCATTAATTTGAGA AGTTGGGCGCTGGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGTGGGGA CCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAAGGG GCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGCAGCAAGGGGCTGCAAGCCTCCCCA CACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGA TGGCTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAGCCAGATGTTCCGGCCC CAGCCCCCTTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGTGCCCGACCTGCTGGTGGCACTCTGGAAGGG CCAAGACTCTCTCCCAGGGAAGAATGGGGTCGTCAAAGACGTTTTTGCCTTTGGGGGTGCCGTGGA GAACCCCGAGTACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCTCCTCTGCCTTCAGC CCAGCCTTCGACAACCTCTATTACTGGGACCAGGACCCACCAGAGCGGGGGGCTCCACCCAGCACCT TCAAAGGGACACCTACGGCAGAGAACCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGCGGCCGCCCCCA CCCGCTCACCAACCTGTACCCGGCCCTGGAAGCATGTAGATGCCATCAAAGAAGCTCTGAGCCT CCTAAATGACATGCGTGTCTGGAGAACGAAAAGAACGAAGACGTAGACATCATCTCTAATGAGTTC TCCATCCAGAGGCCGACATGTGTGCAGACCCGCTGAAGCTATACAAGCAGGGTCTACGGGGCAACC TCACCAAACCTCAATGGCGCCTTGACCATGATAGCCAGCCACTACCAGACGAACCTGCCCTCAACCCC GGAAACTGACTGTGAAATAGAAGTCACCACCTTTGAGGATTCATAAAGAACCTTAAAGGCTTTCTG TTTGATATCCCTTTTGAAGTGTGGAAGCCGGTCCAGAAAGGCGCGCCACCCCCGCCGGCGCATCACC ATCACCATCAC	9
Secuencia codificadora nucleotídica de HER300*-rGM-CSF: ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTCTTCTGCTTTT TTTCTGGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCGCGTCGACCCAAGTGTGC ACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACC TCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCT GTCCTTCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAG GTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACATATGCCCTGGCCG TGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGGCTCCCCAGGAGGCCTGCG GGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAG CTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACAC TGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGG GGAGAGAGTTCTGAGGATTGTGAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCA AGGGGCCACTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTC TGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCA CCTACAACACAGACACGTTTGTAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCCGGCCAGCTG TGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCGCTAGCATCATTAATTTGAGA AGTTGGCGGCCCCACCCGCTCACCAACCTGTACCCGGCCCTGGAAGCATGTAGATGCCATCAAAGAAGCTCTGAGCCT AGAAGCTCTGAGCCTCCTAAATGACATGCGTGTCTGGAGAACGAAAAGAACGAAGACGTAGACAT CATCTCTAATGAGTTCTCCATCCAGAGGCCGACATGTGTGCAGACCCGCTGAAGCTATACAAGCAG GGTCTACGGGGCAACCTACCAAACTCAATGGCGCCTTGACCATGATAGCCAGCCACTACCAGACGA ACTGCCCTCAACCCCGGAAACTGACTGTGAAATAGAAGTCACCACCTTTGAGGATTTTATAAAGAA CCTTAAAGGCTTTCTGTTTGTATATCCCTTTTGAAGTGTGGAAGCCGGTCCAGAAAGGCGCGCCACCCC CGCCGGCGCATCACCATCACCATCAC	10

32 aminoácidos de la secuencia señal de PAP: (correspondiente a los aminoácidos 1 a 32 del N° de acceso en GenBank NM_001099)	11
MRAAPLLARAASLSLGFLFLFFWLD RSVLA	
3 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la PAP madura: (correspondiente a los aminoácidos 33 a 35 del N° de acceso en GenBank NM_001099)	12
KEL	
3 aminoácidos de la secuencia señal de HER-2: (correspondiente a los aminoácidos 19 a 21 del N° de acceso en GenBank M11730)	13
GAA	
Secuencia conectora de 2 aminoácidos entre la PAP madura y la secuencia señal de HER-2: Ala Arg	14
Secuencia C-terminal de 9 aminoácidos encontrada en construcciones de HER500 y HER500*: Ala Ala Ala His His His His His His	15
Secuencia C-terminal de 15 aminoácidos encontrada en HER500-hGM-CSF: Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala His His His His His His	16
Secuencia C-terminal de 13 aminoácidos encontrada en construcciones de HER500* y HER300*rGM-CSF: Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala His His His His His His His	17
Secuencia de aminoácidos del GM-CSF humano maduro (correspondiente a los aminoácidos 18 a 144 del N° de acceso en GenBank NM_000758)	18
APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS LT KLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE	
Secuencia de nucleótidos del GM-CSF humano maduro (correspondiente a los nucleótidos 60 a 440 al N° de acceso en Gen Bank NM-000758)	19
GCACCCGCCCGCTCGCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCC GGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGA AATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGG GGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTC CAACCCCGGAAACTTCTGTGCAACCCAGACTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACC TGAAGGA CTTTCTGCTTGTATCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAG	
Secuencia de aminoácidos del GM-CSF de rata maduro (correspondiente al los nucleótidos 1 a 127 del N° de acceso en GenBank U00620)	20
APTRSPNPVTRPWKHVDAIKEALSLLNDMRALENEKNEDVDIISNEFSIQRPTCVQTRLKLYKQGLRGNLT KLNGALTMIA SHYQTNCPPTPETDCEIEVTTTFEDFIKNLKGFLDIPFDCWKPVQK	
Secuencia de nucleótidos del GM-CSF de rata maduro (correspondiente a los nucleótidos 1 a 381 en el N° de acceso en GenBank U00620)	21
GCACCCACCCGCTCACCCAACCCTGTCACCCGGCCCTGGAAGCATGTAGATGCCATCAAAGAAGCTC TGAGCCTCCTAAATGACATGCGTGCTCTGGAGAACGAAAAGAAGACG TAGACATCATCTCTAA TGAGTTCTCCATCCAGAGGCCGACATGTGTGCAGACCCGCTGAAAGCTATACAAGCAGGGTCTACGG GGCAACCTCACCAAACTCAATGGCGCCTTGACCATGATAGCCAGCCACTACCAGACGAAGTCCCTC CAACCCCGGAAACTGACTGTGAAATAGAAGTACCACCTTTGAGGATTTTATAAAGAACCTTAAAGG CTTTCTGTTTGATATCCCTTTTACTGCTGGAAGCCGGTCCAGAAA	
Péptido informador en las construcciones HER500* y HER500*rGM-CSF (Octapéptido inmunodominante derivado de OVA SIINFEKL (OVA 257-264)	22
289 aminoácidos derivados del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura (aminoácidos 22 a 310 del N° de acceso en GenBank M11730)	23
STQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHL YQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIH NQ VRQVPLQRLRIVRG TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQL CYQDTILWKDIFHKNNQLALTLDITNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSDCQSLTRTV CAGGCARCKGPL PTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALV TYNTDTFESMPNPEG RYTFGASCVTACPY NYLSTDVGS	

Secuencia codificadora para los 289 aminoácidos del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura; (nucleótidos 214 a 1080 de N° de acceso en Genbank M11730) AGCACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCAGACCCACCTGG ACATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCC CACCAATGCCAGCCTGTCCTTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCAC AACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACA ACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGGCCTC CCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATC CAGCGGAACCCCAAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACC AGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAG GGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTGAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTG GCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGTGCAC GGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCAC TGCCCAGCCCTGGTCACCTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATA CATTCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCC	24
217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2 : (aminoácidos 1038 a 1254 del N° de acceso en GenBank M11730) GAGGMVHHRHRSSTRSGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGLMGAAKGLQSLPTHDP PLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNPQDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKT LSPGKN GVVKDVFAFGGAVENPEYLTQGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEY LGLDVP	25
Secuencia codificadora para 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2: (nucleótidos 3262 a 3912 del N° de acceso en GenBank M11730) GGCGCTGGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGTGGGGACCTGA CACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAAGGGGCTGG CTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGCAGCCAAGGGGCTGCAAAGCCTCCCCACACAT GACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGATGGCTA CGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACAGCCAGATGTTTCGGCCCCAGCCCC CTTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCGACCTGCTGGTGCCACTCTGGAAGGGCCAAGACT CTCTCCCCAGGGAAGAATGGGGTCTGCAAAAGCGTTTTTGCCTTTGGGGGTGCCGTGGAGAACCCGA GTACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCCCTAGCCCCACCCTCCTCCTGCCTTCAGCCAGCCTTCG ACAACCTCTATTACTGGGACCAGGACCCACAGAGCGGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGAC ACCTACGGCAGAGAACCCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCA	26
Secuencia de aminoácidos de NY-ESO-IC: aminoácidos 1 a 180 del N° de acceso en GenBank U87459 fusionado a los 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana (aminoácidos 1038 a 1254 del N° de acceso en GenBank M11730)	27
Secuencia de DNA de NY-ESO-IC: nucleótidos 54 a 593 de N° de acceso en GenBank U87459 fusionados a la secuencia codificadora para los 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de HER-2 (nucleótidos 3262 a 3912 del N° de acceso en GenBank M11730):	28
Secuencia de aminoácidos de SART3-IC: aminoácidos 1 a 962 del N° de acceso en GenBank AB020880 fusionados a los 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de HER-2 de membrana (aminoácidos 1038 a 1254 del N° de acceso en GenBank M11730)	29
Secuencia de DNA de SARTE3-IC: nucleótidos 20 a 2905 del N° de acceso en GenBank AB020880 fusionados a la secuencia codificadora de los 217 aminoácidos del dominio intracelular distal de membrana de HER-2 (nucleótidos 3262 a 3912 del N° de acceso en GenBank M11730).	30

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora, que comprende:
 un componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica y un componente de secuencia seleccionado del grupo que consiste en HER500 (SEQ ID NO:1), HER500•hGM-CSF (SEQ ID NO:2), HER500* (SEQ ID NO:3) y HER500*•rGM-CSF (SEQ ID NO:4), donde dicha proteína de fusión inmunoestimuladora es eficaz para generar una respuesta inmunitaria celular al componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica de la proteína de fusión.
2. La proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora de la reivindicación 1, en donde el componente de secuencia antigénica del dominio intracelular de HER-2 tiene la secuencia presentada como SEQ ID NO:25.
3. La proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora de la reivindicación 1, en donde el componente polipeptídico o proteínico está asociado con células tumorales.
4. La proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora de la reivindicación 1, en donde el componente polipeptídico o proteínico es la secuencia del dominio extracelular distal de membrana de HER-2 madura presentada como SEQ. ID. NO:23.
5. La proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión es HER500•hGM-CSF (SEQ ID NQ:2).
6. La proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora de la reivindicación 1, en donde la respuesta celular inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T e inducida por células dendríticas.
7. Una composición de proteína de fusión inmunoestimuladora, que comprende la proteína de fusión inmunoestimuladora de la reivindicación 1 y células dendríticas súper-activadas por exposición *in vitro* a la proteína de fusión inmunoestimuladora.
8. Un método *in vitro* de producir DC súper-activadas por exposición a una proteína de fusión inmunoestimuladora, que comprende:
 exponer una célula dendrítica (DC) o una precursora de célula dendrítica (DCP) a la proteína de fusión inmunoestimuladora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, de un modo eficaz que de como resultado una respuesta inmunitaria celular al componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica de la proteína de fusión.
9. Uso de la proteína de fusión inmunoestimuladora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de una composición farmacéutica para producir DC súper-activadas exponiendo una célula dendrítica (DC) o una precursora de célula dendrítica (DCP) de un modo eficaz que de cómo resultado una respuesta inmunitaria celular al componente de secuencia antigénica polipeptídica o proteínica de la proteína de fusión.
10. El uso de una proteína de fusión de HER-2 inmunoestimuladora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer en donde el cáncer está asociado con un antígeno particular.
11. El uso de DC súper-activadas como se definen en la reivindicación 8 o 9, en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer, en donde el cáncer está asociado con un antígeno particular.

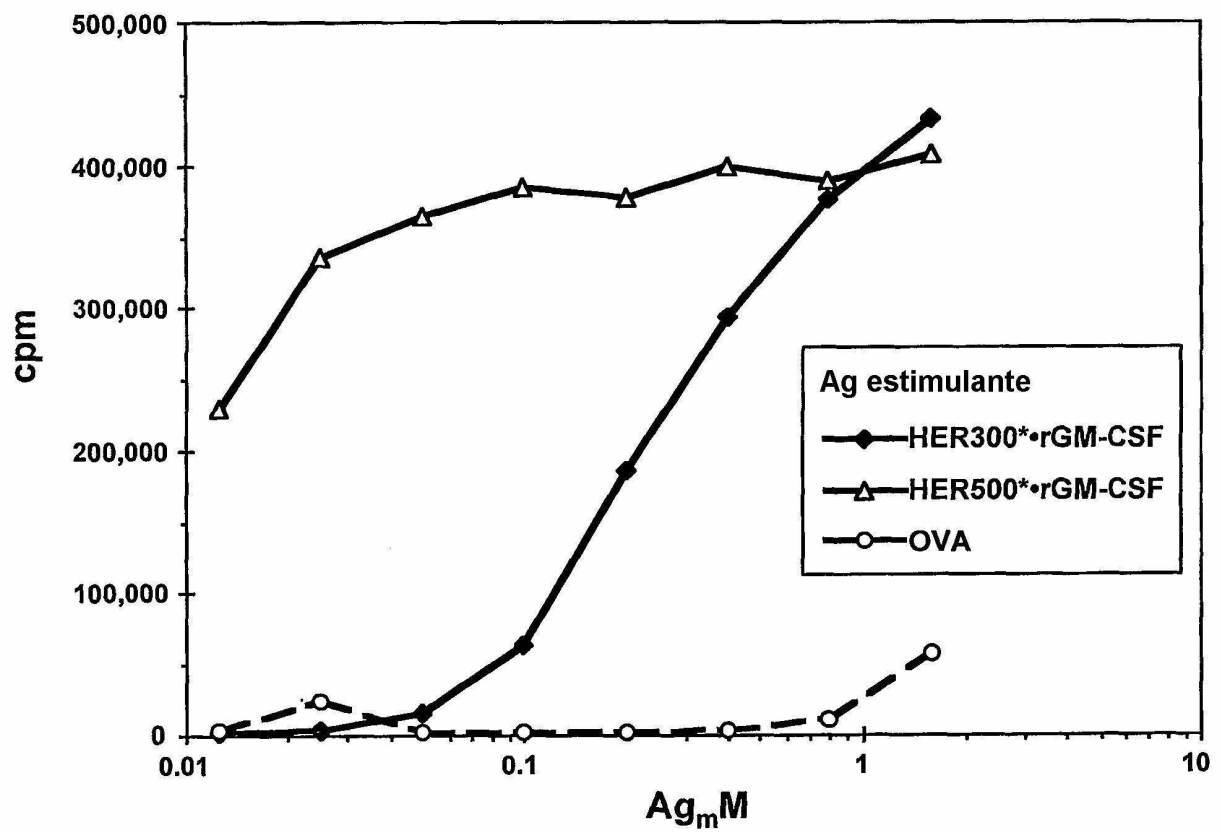


Fig. 1

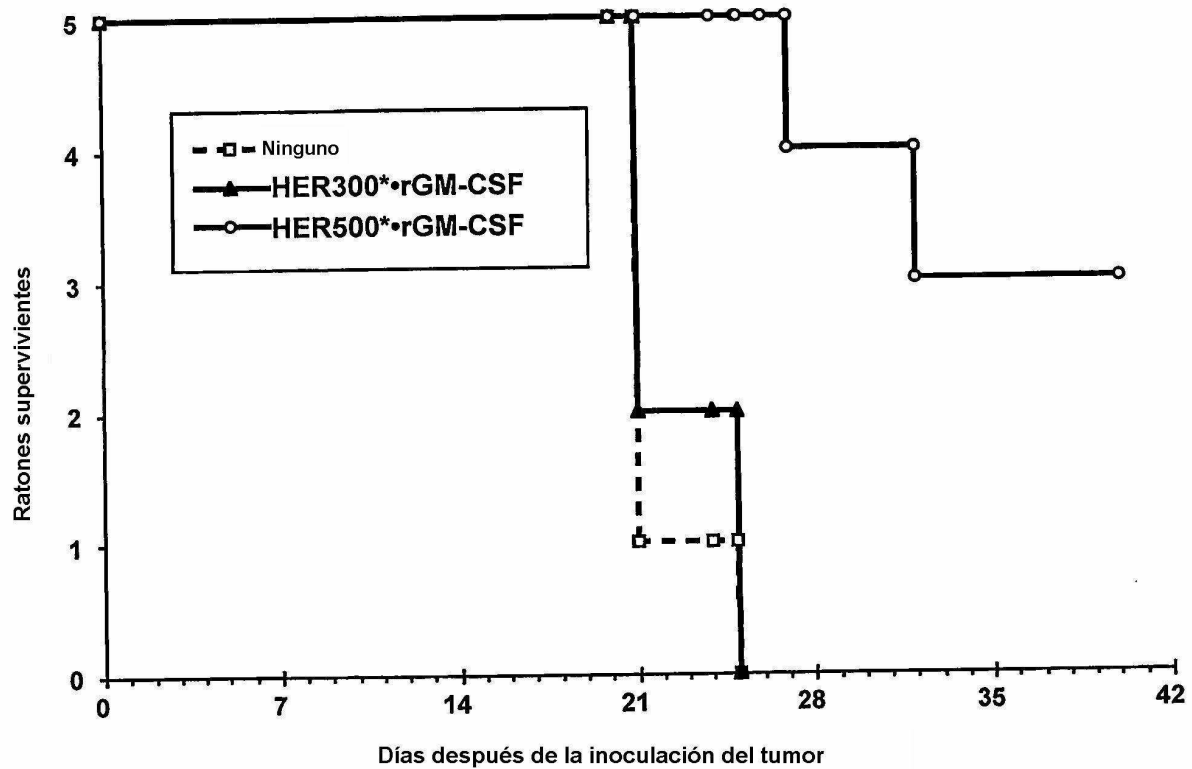


Fig. 2A

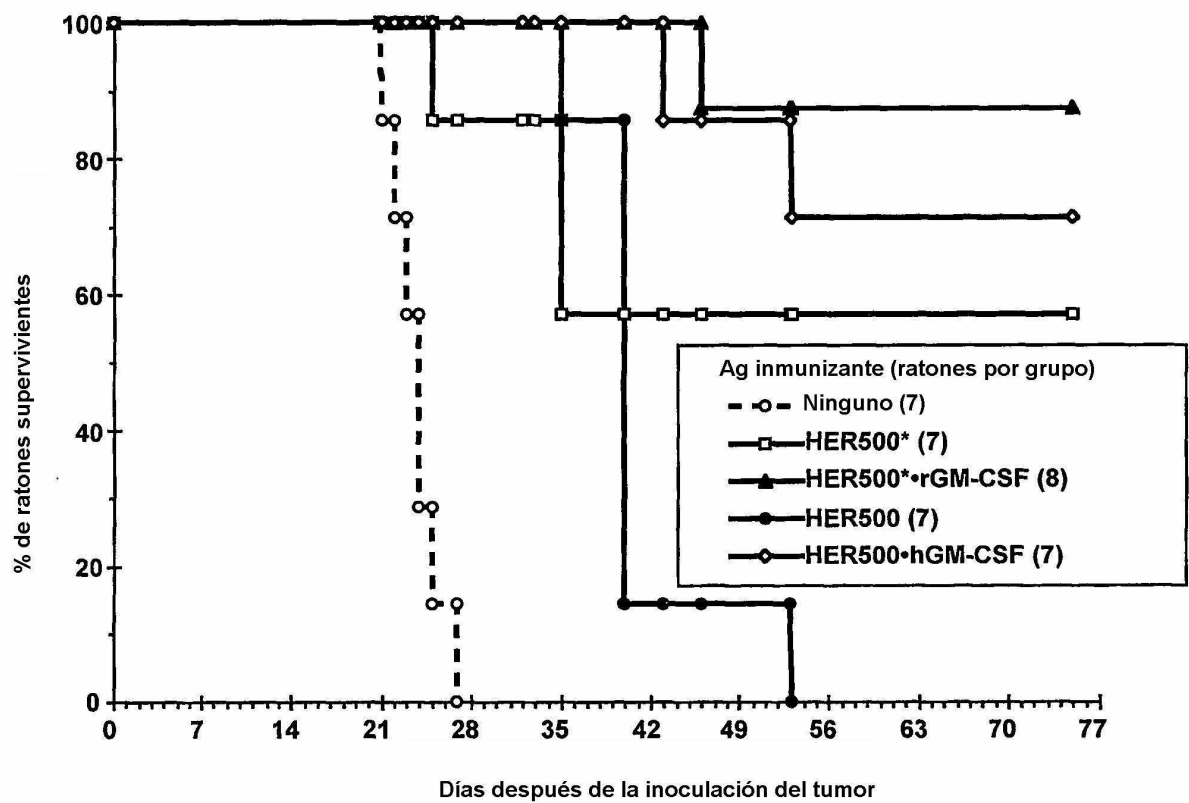


Fig. 2B

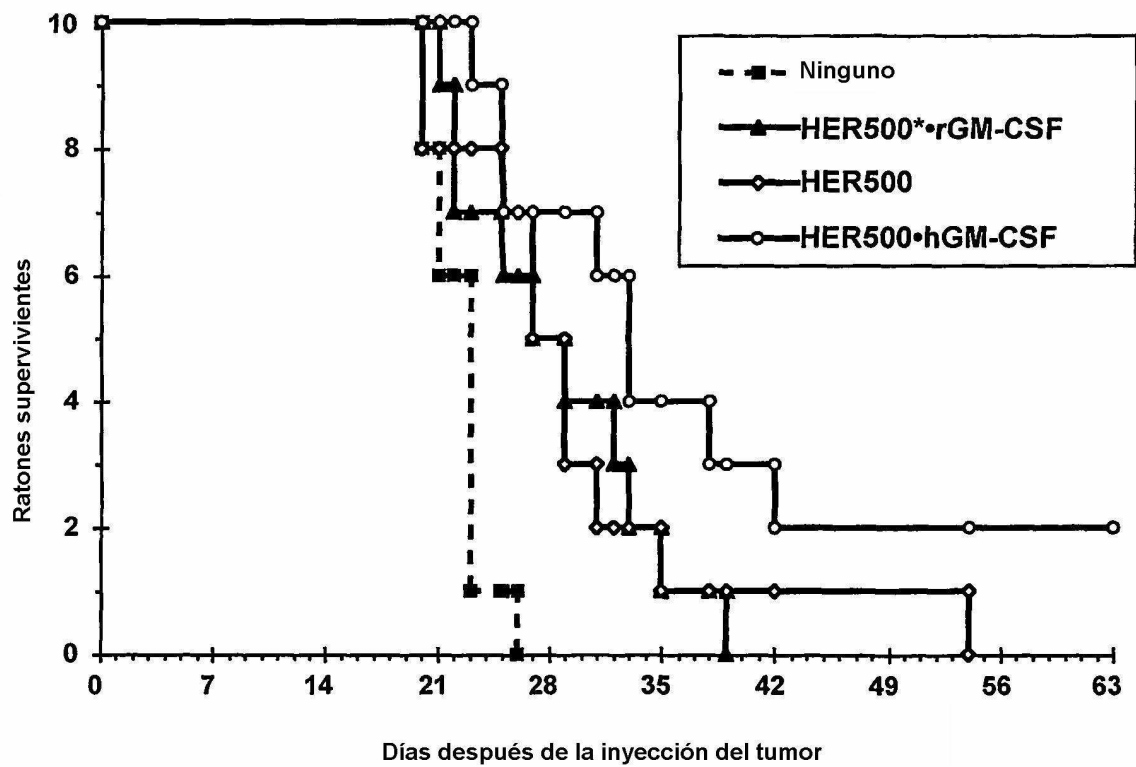


Fig. 3