



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 783**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01) **C07K 14/47** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) **C12N 1/21** (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05076599 .9**

96 Fecha de presentación : **02.02.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1584685**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.10.2005**

54

Título: **Derivados antígenos asociados a tumores de la familia MAGE, usados para la preparación de proteínas de fusión con epítopes de auxiliares T y de composiciones para vacunación.**

30

Prioridad: **05.02.1998 GB 9802543**
06.02.1998 GB 9802650

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.07.2011

73

Titular/es: **GlaxoSmithKline Biologicals S.A.**
89, rue de l'Institut
1330 Rixensart, BE

72

Inventor/es: **Cabezón Silva, Teresa;**
Cohen, Joseph;
Slaoui, Moncef M. y
Vinals Bassols, Carlota

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 783 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

Derivados antígenos asociados a tumores de la familia mage, usados para la preparación de proteínas de fusión con epítopes de auxiliares T y de composiciones para vacunación

- 5 La presente invención se refiere a proteínas de fusión como se muestra en las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere a derivados de proteínas, que comprenden un antígeno asociado a tumores, que encuentran utilidad en terapia de vacunas de cáncer. En particular los derivados de la divulgación incluyen proteínas de fusión que comprenden un antígeno codificado por la familia de genes MAGE (por ejemplo MAGE-3, MAGE-1), unido a una pareja de fusión inmunológica que proporciona epítopes de auxiliares T, tales como, por ejemplo, la forma lipídada de la proteína D de Haemophilus influenzae B; proteínas MAGE químicamente modificadas en las que los puentes disulfuro del antígeno están reducidos y los tioles resultantes están bloqueados y las proteínas MAGE genéticamente modificadas se proporcionan con una marca de afinidad y/o genéticamente modificadas para prevenir la formación de puentes disulfuro. También se describen procedimientos para purificar proteínas MAGE y para formular vacunas para tratar una gama de cánceres, que incluye, pero no se limita a, melanoma, mama, vejiga, pulmón, NSCLC, cabeza y carcinoma de células escamosas, carcinoma de colon y carcinoma de esófago.
- 10 Los antígenos codificados por la familia de genes MAGE se expresan predominantemente sobre células de melanoma (incluyendo melanoma maligno) y algunos otros cánceres incluyendo NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células transitorias de vejiga y carcinoma de esófago, pero no son detectables sobre tejidos normales excepto en los testículos y placenta (Gaugler, 1994; Weynants, 1994; Patard, 1995). MAGE-3 se expresa en el 69% de los melanomas (Gaugler, 1994), y también se puede detectar en el 44% de NSCLC (Yoshimatsu 1988), 48% de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, 34% de carcinoma de células transitorias de vejiga, 57% de carcinoma de esófago, 32% de cánceres de colon y 24% de cánceres de mama (Van Pel, 1995); Inoue, 1995 Fujie 1997; Nishimura 1997). Los cánceres que expresan proteínas MAGE se conocen como tumores asociados a Mage.
- 15 La inmunogenicidad de células de melanoma humano se ha demostrado con esmero en experimentos que usan cultivos mixtos de células de melanoma y linfocitos autólogos. Estos cultivos a menudo generan linfocitos T citotóxicos específicos (CTL) capaces de lisar exclusivamente las células de melanoma autólogas pero ni fibroblastos autólogos ni los linfocitos B autólogos transformados por EBV (Knuth, 1984; Anichini, 1987). Varios de los antígenos reconocidos sobre células autólogas de melanoma por estos clones de CTL están ahora identificados, incluyendo los de la familia MAGE.
- 20 El primer antígeno que se podría definir a través de su reconocimiento por CTL específicos sobre células de melanoma autólogas se denomina MZ2-E (Van den Eynde, 1989) y está codificado por el gen MAGE-1 (Van der Bruggen, 1991). Los CTL dirigidos contra MZ2-E reconocen y lisan células de melanoma positivas MZ2-E de autólogos así como de otros pacientes con tal que estas células tengan el alelo HLA.A1.
- 25 El gen MAGE-1 pertenece a una familia de 12 genes estrechamente relacionados, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MAGE 5, MAGE 6, MAGE 7, MAGE 8, MAGE 9, MAGE 10, MAGE 11, MAGE 12, localizados en el cromosoma X y que comparten entre sí 64 a 85% de homología en su secuencia codificadora (De Plaen, 1994). Estos son algunas veces conocidos como MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6, MAGE A7, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12 (la familia MAGE A). Otros dos grupos de proteínas también son parte de la familia MAGE aunque relacionados de manera más distante. Estos son el grupo MAGE B y MAGE C. La familia MAGE B incluye MAGE B1 (también conocido como MAGE Xp1, y DAM 10), MAGE B2 (también conocido como MAGE Xp2, y DAM 6), MAGE B3 y MAGE B4 - la familia Mage C actualmente incluye MAGE C1 y MAGE C2. En términos generales, una proteína MAGE se puede definir por contener una firma de secuencia central localizada hacia el extremo C terminal de la proteína (por ejemplo con respecto a MAGE A1 una proteína de 309 aminoácidos, la firma central corresponde a 195 - 279 aminoácidos).
- 30 El patrón de consenso de la firma del núcleo se describe así como sigue en la que x representa cualquier aminoácido, los residuos del caso inferior se conservan (variantes conservadoras permitidas) y los residuos del caso superior se conservan perfectamente.

Firma de la secuencia central

**LixvL (2x) I (3x) g (2x) apEExiWexl (2x) m (3 - 4x) Gxe (3 -
4x) gxp (2x) llt (3x) VqexYlxYxqVPxsxP (2x) yeFLWGprA (2x) Et (3
x) kv**

- 50 Las sustituciones conservadoras son bien conocidas y generalmente se exponen como las matrices de puntuación por defecto en programas de ordenador de alineación de secuencias. Estos programas incluyen PAM250 (Dayhoff M. O. y col., (1978), "A model of evolutionary changes in proteins", en "Atlas of Protein sequence and structure" 5 (3) M. O. Dayhoff (ed.), 345 - 352), National Biomedical Research Foundation, Washington, y Blosum 62 (Steven Henikoff y Jorja G. Henikoff (1992), "Amino acids substitution matrices from protein blocks", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (Biochemistry): 10915 - 10919).
- 55

En términos generales, la sustitución dentro de los siguientes grupos son sustituciones conservadoras, pero las sustituciones entre los grupos se consideran no conservadas. Los grupos son:

- i) Aspartato / asparagina / glutamato / glutamina

- ii) Serina / treonina
- iii) lisina / arginina
- iv) fenilalanina / tirosina / triptófano
- v) Leucina / isoleucina / valina / metionina
- 5 vi) Glicina / alanina

En general y en el contexto de esta invención, una proteína MAGE será aproximadamente 50% idéntica en esta región central con 195 a 279 aminoácidos de MAGE A1.

10 Varios epítopes de CTL se han identificado sobre la proteína MAGE - 3. Tal epítope, MAGE-3.A1, es una secuencia nonapeptídica localizada entre los 168 y 176 aminoácidos de la proteína MAGE-3 que constituye un epítope específico para las CTL cuando se presentan en asociación con la molécula de la clase I de MHC HLA.A1. Recientemente se han identificado dos epítopes de CTL adicionales sobre la secuencia de péptidos de la proteína MAGE-3 por su capacidad de montar la respuesta CTL en un cultivo mixto de células de melanoma y linfocitos autólogos. Estos dos epítopes tienen motivos de unión específica para los alelos HLA.A2 (Van der Bruggen, 1994) y HLA.B44 (Herman, 1996) respectivamente.

15 Carrel et al (1996) International Journal of Cancer 67(3), 417-422, da a conocer la identificación de un antígeno de 72 kDa que reacciona de forma cruzada que se coexpresa con la proteína MAGE-1 en células de melanoma.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona una proteína de fusión que comprende un antígeno codificado por la familia de genes MAGE unidos a una pareja de fusión seleccionada de:

20 (i) proteína NS1 de Influenza o un fragmento de la misma que comprende los 81 aminoácidos N terminales de la proteína NS1; o

(ii) LytA de *Streptococcus pneumoniae* o un fragmento de la misma que comprende: (a) la parte C terminal de Lyt-A; (b) la parte de repetición de la molécula de LytA hallada en el extremo C terminal que comienza en el residuo 178; y/o (c) 188 - 305 residuos de aminoácidos de LytA

(iii) proteína D de *Haemophilus influenzae* B o un fragmento de la misma que comprende

- 25 (a) aproximadamente el primer 1/3 de la proteína D;
- (b) los primeros 109 aminoácidos de la lipoproteína D; o
- (c) los 100 a 110 aminoácidos N terminales de la proteína D.

30 La presente divulgación proporciona derivados de la proteína MAGE. Tales derivados son adecuados para uso en las formulaciones de vacunas terapéuticas que son adecuadas para el tratamiento de una gama de tipos de tumores.

En una realización de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión que comprende un antígeno de la familia de proteínas MAGE unido a una pareja heteróloga como se describe en las reivindicaciones. Las proteínas se pueden conjugar químicamente, pero se expresan preferentemente como proteínas de fusión recombinantes que permiten la producción de niveles incrementados en una expresión 3.

35 El documento WO95/04542 da a conocer un antígeno de MAGE-1 y la identificación de un sistema de epítopes inmunogénicos en comparación con la proteína no fusionada. De este modo la pareja de fusión puede asistir en la proporción de los epítopes auxiliares T (pareja de fusión inmunológica), preferiblemente epítopes de los auxiliares T reconocidos por seres humanos, o asistir en la expresión de la proteína (potenciador de expresión) a rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. Preferentemente la pareja de fusión será tanto una pareja de fusión
40 inmunológica como una pareja potenciadora de expresión.

En una forma preferida de la invención, la pareja de fusión inmunológica se deriva de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa, *Haemophilus influenzae* B (documento WO91/18926). Preferentemente, el derivado de la proteína D comprende aproximadamente el primer 1/3 de la proteína, en particular, aproximadamente los 100-110 primeros aminoácidos N terminales. Preferentemente, el derivado de la proteína D está lipidado.
45 Preferentemente los 109 primeros residuos de la pareja de fusión de la lipoproteína D se incluye en el extremo N para proporcionar el antígeno candidato de vacuna con epítopes de células T exógenos adicionales e incrementar el nivel de expresión en *E. coli* (actuando así como un potenciador de expresión). La cola lipídica asegura la presentación óptima del antígeno a las células presentadoras de antígeno.

Otras parejas de fusión incluyen la proteína no estructural de virus de la gripe, NS1 (hemaglutinina). Típicamente se utilizan los 81 aminoácidos N terminales, aunque se pueden usar diferentes fragmentos con tal que incluyan epítopes de auxiliares T.
50

En otra realización la pareja de fusión inmunológica es la proteína conocida como LYTA. Preferentemente se usa la porción terminal C de la molécula. LYTA se deriva de *Streptococcus pneumoniae* que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa, amidasa LYTA, (codificada por el gen *lytA* {Gene, 43 (1986) página 265 - 272} una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en la estructura central de peptidoglicano. El dominio C - terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad a la colina o algunos análogos de colina tal como DEAE. Esta propiedad se ha explotado para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA en *E. coli* útiles para la expresión
55

de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de las proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en su extremo amino (Biotechnology: 10, (1992) página 795 - 798). Como se usa en esta memoria descriptiva una realización preferida utiliza la porción repetida de la molécula Lyta encontrada en el extremo C terminal que comienza en el residuo 178. Una forma particularmente preferida incorpora los residuos 188 - 305.

- 5 Las parejas de fusión inmunológicas indicadas anteriormente también son ventajosas para ayudar en la expresión. En particular, tales fusiones se expresan con rendimientos mayores que las proteínas MAGE recombinantes nativas.

Los presentes inventores han mostrado que tales construcciones en un escenario clínico son capaces de tratar melanomas. En un caso, se eliminó la metástasis de un paciente con melanoma de fase IV después de dos dosis de proteína lipo D 1/3 MAGE 3 His no adyuvantada.

- 10 De acuerdo con lo anterior, la presente invención en la realización proporciona proteínas de fusión que comprenden un antígeno asociado a tumores derivado de la familia MAGE unidos a una pareja de fusión inmunológica. Preferentemente, la pareja de fusión inmunológica es proteína D o un fragmento de la misma, más preferentemente lipoproteína D. Las proteínas MAGE son preferentemente MAGE A1 o MAGE A3. La parte de lipoproteína D comprende preferentemente el primer 1/3 de la lipoproteína D.

- 15 Las proteínas de la presente invención se expresan preferentemente en *E. coli*. En una realización preferida las proteínas se expresan con una marca de afinidad, tal como por ejemplo, una cola histidina que comprende entre 5 y 9 y preferentemente seis residuos histidina. Éstos son ventajosos ayudando a la purificación.

- La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica las proteínas de la presente invención. Tales secuencias se pueden insertar en un vector de expresión adecuado y usar para vacunación de ADN / ARN o expresar en un huésped adecuado. Los vectores microbianos que expresan el ácido nucleico se pueden usar como vacunas. Tales vectores incluyen por ejemplo, poxvirus, adenovirus, alfavirus, listeria y monarfacto.
- 20

- Una secuencia de ADN que codifica las proteínas de la presente invención se pueden sintetizar usando técnicas de síntesis de ADN convencionales, tales como mediante ligamiento enzimático como describen D. M. Roberts y col, en Biochemistry 1985, 24, 5090 - 5098, mediante síntesis química, mediante polimerización enzimática *in vitro*, o mediante tecnología PCR que utiliza por ejemplo una polimerasa estable al calor, o mediante una combinación de estas técnicas.
- 25

- La polimerización enzimática de ADN se puede llevar a cabo *in vitro* usando una ADN polimerasa tal como ADN polimerasa I (fragmento Klenow) en un tampón apropiado que contiene los trifosfatos de nucleósidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP como se requiere a una temperatura de 10° a 37°C, generalmente en un volumen de 50 µl o menos. El ligamiento enzimático de los fragmentos de ADN se puede llevar a cabo usando una ADN ligasa tal como ADN ligasa de T4 en un tampón apropiado tal como Tris 0,05 M (pH 7,4), MgCl₂ 0,01 M, ditiotreitól 0,01 M, espermidina 1 mM, ATP 1 mM y 0,1 mg/ml de albúmina sérica bovina, a una temperatura de 4°C a ambiente, generalmente en un volumen de 50 µl o menos. La síntesis química del polímero o fragmentos de ADN se puede llevar a cabo mediante química convencional de fosfotriéster, fosfito o fosforamida, usando técnicas de fase sólida tal como las descritas en 'Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual' (ed. H. G. Gassen y A. Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982), o en otras publicaciones científicas, por ejemplo M. J. Gait, H. W. D. Matthes, M. Singh, B. S. Sproat, y R. C. Titmas, Nucleic Acids Research, 1982, 10, 6243; B. S. Sproat, y W. Bannwarth, Tetrahedron Letters, 1983, 24, 5771; M. D. Matteucci y M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters, 1980, 21, 719; M. D. Matteucci y M. H. Caruthers, Journal of the American Chemical Society, 1981, 103, 3185; S. P. Adams et al., Journal of the American Chemical Society, 1983, 105, 661; N. D. Sinha, J. Biernat, J. McMannus, y H. Koester, Nucleic Acids Research, 1984, 12, 4539; y H. W. D. Mattes y col., EMBO Journal, 1984, 3, 801.
- 30
- 35
- 40

El procedimiento de la invención se puede realizar mediante técnicas recombinantes convencionales tal como describen Maniatis y col., Molecular Cloning - A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, 1982 - 1989.

En particular, el procedimiento puede comprender las etapas de:

- 45 i) preparar un vector de expresión replicable o de integración capaz, en una célula huésped, de expresar un polímero de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína o un derivado inmunogénico de la misma;
- ii) transformar una célula huésped con dicho vector;
- 50 iii) cultivar dicha célula huésped transformada en condiciones que permiten la expresión de dicho polímero de ADN para producir dicha proteína; y
- iv) recuperar dicha proteína.

- El término 'transformación' se usa en esta memoria descriptiva para significar la introducción de ADN foráneo en una célula huésped. Esto se puede lograr por ejemplo mediante transformación, transfección o infección con un plásmido apropiado o vector viral que usa, por ejemplo, técnicas convencionales como se describe en Genetic Engineering: Eds. S. M. Kingsman y A. J. Kingsman; Blackwell Scientific Publications; Oxford, Inglaterra, 1988. El término 'transformado' o 'transformante' se aplicará de aquí en adelante a la célula huésped resultante que contiene y expresa el gen foráneo de interés.

Los vectores de expresión son novedosos y también forman parte de la invención.

- 60 Los vectores de expresión replicables se pueden preparar de acuerdo con la invención, mediante escisión de un

vector compatible con la célula huésped para proporcionar un segmento de ADN lineal que tiene un replicón intacto, y combinando dicho segmento lineal con una o más moléculas de ADN que, junto con dicho segmento lineal codifican el producto deseado, tal como el polímero de ADN que codifica la proteína de la invención, o derivado de la misma, en condiciones ligantes.

5 De este modo, el polímero de ADN se puede preformar o formar durante la construcción del vector, según se desee.

La elección del vector se determinará en parte por la célula huésped, que puede ser procariótica o eucariótica pero son preferiblemente *E. coli* o células CHO. Los vectores adecuados incluyen plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y virus recombinantes.

10 La preparación del vector de expresión replicable se puede llevar a cabo de manera convencional con enzimas apropiadas para restricción, polimerización y ligamiento del ADN, mediante procedimientos descritos en por ejemplo, Maniatis y col., citado anteriormente.

15 La célula huésped recombinante se prepara, de acuerdo con la invención, transformando una célula huésped con un vector de expresión replicable de la invención en condiciones de transformación. Las condiciones adecuadas de transformación son convencionales y se describen, por ejemplo, en Maniatis et al., citado anteriormente, o "DNA Cloning" Vol. II, D. M. Glover ed., IRL Press Ltd, 1985.

20 La elección de las condiciones de transformación la determina la célula huésped. De esta manera, un huésped bacteriano tal como *E. coli* se puede tratar con una solución de CaCl_2 (Cohen y col., Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, 69, 2110) o con una solución que comprende una mezcla de RbCl , MnCl_2 , acetato de potasio y glicerol, y después con ácido 3-[N-morfolino]-propano-sulfónico, RbCl y glicerol. Las células de mamífero en cultivo se pueden transformar mediante coprecipitación con calcio del ADN del vector en las células. La invención también se extiende a una célula huésped transformada con un vector de expresión replicable de la invención.

25 El cultivo de la célula huésped transformada en condiciones que permiten la expresión del polímero de ADN se lleva a cabo de manera convencional, como se describe, por ejemplo, en Maniatis y col. y en "DNA Cloning" citado anteriormente. De esta manera, preferiblemente la célula se suministra con nutriente y se cultiva a una temperatura por debajo de 50°C.

30 El producto se recupera mediante procedimientos convencionales de acuerdo con la célula huésped y de acuerdo con la localización del producto de expresión (intracelular o secretado en el medio de cultivo o en el periplasma de la célula). De este modo, cuando la célula huésped es bacteriana, tal como *E. coli*, se puede, por ejemplo, lisar física, química o enzimáticamente y el producto proteico se aísla del lisado resultante. Cuando la célula huésped es un mamífero, el producto generalmente se puede aislar del medio nutriente o de los extractos libres de células. Las técnicas de aislamiento de proteínas convencionales incluyen precipitación selectiva, cromatografía de adsorción, y cromatografía de afinidad que incluye una columna de afinidad de anticuerpos monoclonales.

Las proteínas de la presente invención se proporcionan o bien solubles en una forma líquida o en una forma liofilizada.

35 En general se espera que cada dosis humana comprenderá 1 a 1000 μg de proteína, y preferentemente 30 - 300 μg .

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de la presente invención en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Una composición de vacuna preferida comprende al menos lipoproteína D - MAGE-3. Tal vacuna puede contener opcionalmente uno o más de otros antígenos asociados a tumores. Por ejemplo otros miembros que pertenecen a las familias MAGE y GAGE. Otros antígenos asociados a tumores adecuados incluyen MAGE - 1 y GAGE - 1 o proteínas de tirosinasa.

La preparación de vacunas generalmente se describe en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M. F. & Newman M. J.). (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas la describe Fullerton, patente de Estados Unidos nº 4.235.877.

45 Las proteínas de la presente invención se adyuvantan preferentemente en la formulación de vacuna de la invención. Los adyuvantes adecuados incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos o polifosfocenos derivatizados catiónicamente o anióticamente. Otros adyuvantes conocidos incluyen oligonucleótidos que contienen CpG. Los oligonucleótidos se caracterizan porque el dinucleótido CpG está sin metilar. Tales oligonucleótidos se conocen bien y se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/02555.

50 En la formulación de las invenciones se prefiere que la composición de adyuvantes induzca una respuesta inmune preferentemente del tipo TH1. Los sistemas de adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente 3-des-O-acilado monofosforil lípido A (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Los oligonucleótidos CpG también inducen preferentemente una respuesta TH1.

55 Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina particularmente la combinación de QS21 y 3D- MPL como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 se inactiva con colesterol como se describe en el documento WO 96/33739.

60 Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210 y es una formulación preferida.

De acuerdo con lo anterior en una realización de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende una proteína de la presente invención, más preferentemente una lipoproteína D (o derivado de la misma) - MAGE-3 adyuvantada con un monofosforil lípido A o derivado del mismo.

Preferentemente, la vacuna adicionalmente comprende una saponina, más preferentemente QS21.

- 5 Preferentemente, la formulación adicional comprende una emulsión de aceite en agua y tocoferol. La presente divulgación también proporciona un procedimiento para producir una formulación de vacuna que comprende mezcla de una proteína de la presente invención junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como 3D-MPL.

10 En un aspecto de la divulgación se proporciona un procedimiento para purificar una proteína MAGE producida de manera recombinante. El procedimiento comprende la solubilización de la proteína, por ejemplo en un agente caotrópico fuerte (tal como por ejemplo, urea, clorhidrato de guanidinio), o en un detergente de ion bipolar, por ejemplo, (Empigen BB -n-dodecil-N,N-dimetilglicina), que reduce los enlaces intra e intermoleculares disulfuro de la proteína, bloqueando los tioles resultantes para evitar el reacomplamiento oxidante, y someter la proteína a una o más etapas cromatográficas.

15 Preferiblemente, el agente bloqueante es un agente alquilante. Tales agentes bloqueantes incluyen pero no se limitan a haloácidos alfa o haloamidas alfa. Por ejemplo ácido yodoacético y yodoacetamida que da como resultado la carboximetilación o carboxiamidación (carbamidometilación) de la proteína. Otros agentes bloqueantes se pueden usar y se describen en la bibliografía (véase, por ejemplo, The Proteins Vol II Eds H neurath, RL Hill y C - L Boeder, Academic Press 1976, o Chemical Reagents for Protein modification Vol I eds. RL Lundblad y CM Noyes, CRC Press 1985). Los ejemplos típicos de tales otros agentes bloqueantes incluyen N-etilmaleimida, fosfato de cloroacetilo, O-metilisourea y acrilonitrilo. El uso del agente bloqueante es ventajoso ya que previene la agregación del producto, y asegura la estabilidad de la purificación cadena abajo.

20 En una realización de la divulgación, los agentes bloqueantes se seleccionan para que induzcan un derivado covalente e irreversible estable (por ejemplo haloácidos alfa o haloamidas alfa). Sin embargo, se pueden seleccionar otros agentes bloqueantes de manera que después de la purificación el agente bloqueante se pueda retirar para liberar la proteína no derivatizada.

25 Las proteínas MAGE que tienen residuos tiol libres derivatizados son nuevas y forman un aspecto de la divulgación. En particular, los derivados carboxiamidados o carboximetilados son una realización preferida de la invención.

30 En una realización preferida de la invención las proteínas de la presente invención se proporciona con una marca de afinidad, tal como CLYTA o una cola de polihistidina. En tales casos, la proteína después de la etapa de bloqueo se somete preferiblemente a cromatografía de afinidad. Para las proteínas con una cola de polihistidina, se puede realizar cromatografía de afinidad por ion metálico inmovilizado (IMAC). El ion metálico, puede ser cualquier ion metálico por ejemplo, cinc, níquel, hierro, magnesio o cobre, pero es preferentemente cinc o níquel. Preferentemente, el tampón IMAC contiene un detergente de ion bipolar tal como Empigen BB (de aquí en adelante en esta memoria descriptiva Empigen) ya que esto da como resultado niveles inferiores de endotoxina en el producto final.

35 Si la proteína se produce con una parte Clyta, la proteína se puede purificar explotando su afinidad para colina o análogos de colina tal como DEAE. En una realización de la invención las proteínas se proporcionan con una cola de polihistidina y una parte Clyta. Estas se pueden purificar en un programa sencillo de purificación cromatográfico de afinidad de dos etapas.

40 La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos:

Ejemplo I:

Preparación de la cepa de *E. coli* recombinante que expresa la proteína de fusión lipoproteína D-MAGE-3-His (LPD 1/3-MAGE-3-His o LpD MAGE-3-His)

1. El sistema de expresión de *E. coli*:

45 Para la producción de Lipoproteína D, el ADN que codifica la proteína D se ha clonado en el vector de expresión pMG 81. Este plásmido utiliza señales del ADN del fago lambda que dirige la transcripción y traducción de genes foráneos insertados. El vector contiene el promotor de PL lambda PL, operador OL y dos sitios de utilización (NutL y NutR) para liberar los efectos de polaridad transcripcional cuando se proporciona la proteína N (Gross et al., 1985 Mol. & Cell. Biol. 5:1015). Los vectores que contienen el promotor PL, se introducen en un huésped lisogénico de *E. coli* para estabilizar el ADN de plásmido. Las cepas huésped lisogénicas contienen ADN de fago lambda defectuoso de replicación integrado en el genoma (Shatzman y col., 1983; en Experimental Manipulation of Gene Expression. Inouya (ed) p. 1 - 14. Academic Press N. Y.) El ADN del fago lambda dirige la síntesis de la proteína represora cl que se une al represor OL del vector y previene la unión de ARN polimerasa al promotor PL y por lo tanto la transcripción del gen insertado. El gen cl de la cepa de expresión AR58 contiene una mutación sensible a temperatura de manera que la transcripción dirigida por PL se puede regular por deslazamiento de temperatura, es decir, un incremento en la temperatura de cultivo inactiva el represor y se inicia la síntesis de la proteína foránea. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas foráneas especialmente de aquellas que pueden ser tóxicas a la célula (Shimataka & Rosenberg, 1981. Nature 292: 128).

2. La cepa de *E. coli* AR58:

60 La cepa de *E. coli* lisogénica AR58 usada para la producción de la proteína LPD-MAGE-3-His es un derivado de la cepa de K12 de *E. coli* de NIH N99 patrón (F-su- galK2, LacZ-thr). Contiene un fago lambda lisogénico defectuoso (galE::TN10, 1 Kil-cl857 DH1). El fenotipo Kil previene el corte de la síntesis macromolecular del huésped. La

mutación cl857 confiere una lesión sensible a la temperatura al represor cl. La supresión DH1 retira el operón derecho del fago lambda y los loci bio, uvr3, y chlA de huéspedes. La cepa AR58 se generó mediante transducción de N99 con una disolución madre de fago lambda P desarrollada previamente sobre un derivado SA500 (galE::TN10, 1 Kil-c-1857 DH1). La introducción del lisogen defectuoso en N99 se seleccionó con tetraciclina en virtud de la presencia de un transposón TN10 que codifica resistencia a tetraciclina en el gen adyacente galE. N99 y SA500 son cepas de *E. coli* K12 derivadas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el Instituto Nacional de Salud.

3. Construcción del vector diseñado para expresar la proteína recombinante LPD-MAGE-3-His:

Lo racional era expresar MAGE 3 como una proteína de fusión que usa el tercio N-terminal de la proteína D lipídada como una pareja de fusión conectada en el extremo N de MAGE-3 y una secuencia de varios residuos de histidina (cola His) colocada en el extremo C.

La proteína D es una lipoproteína (una proteína de unión a la inmunoglobulina D de 42 kDa expuesta sobre la superficie de la bacteria Gram - negativa *Haemophilus influenzae*). La proteína se sintetiza como un precursor con una secuencia señal de residuo de 18 aminoácidos, que contiene una secuencia de consenso para la lipoproteína bacteriana (documento WO 91/18926).

Cuando la secuencia señal de una lipoproteína se procesa durante la secreción, la Cys (en la posición 19 en la molécula precursora) llega a ser el residuo amino terminal y se modifica de manera simultánea mediante unión covalente de ácidos grasos tanto unidos por éster como unidos por amida.

Los ácidos grasos unidos al residuo cisteína amino terminal funcionan entonces como un anclaje de membrana.

El plásmido que expresa la proteína de fusión se diseñó para expresar una proteína precursora que contiene una secuencia señal de 18 aminoácidos y los primeros 109 restos de la proteína D procesada, dos aminoácidos no relacionados (Met y Asp), residuos de aminoácidos 2 a 314 de MAGE-3, dos residuos Gly que funcionan como una región bisagra para exponer los siete residuos His posteriores.

La cepa recombinante de esta manera produce la proteína de fusión con cola His lipídada procesada de 432 residuos de aminoácidos (véase la figura 1), con la secuencia de aminoácidos descrita en ID N.º 1 y la secuencia codificadora se describe en ID N.º 2.

4. Estrategia de clonación para la generación de la proteína de fusión LPD-MAGE-3-His (vector pRIT14477):

Se usaron un plásmido de ADNc (del Dr Thierry Boon del Instituto Ludwig) que contiene la secuencia codificadora para el gen MAGE-3 (Gaugler B y col., 1994), y el vector PRIT 14586, que contiene la porción N-terminal de la secuencia codificadora de Lipo-D-1/3 (preparada como se esquematiza en la figura 2). La estrategia de clonación incluía las siguientes etapas (figura 3).

a) - Amplificación de PCR de las secuencias presentadas en el plásmido MAGE del ADNc usando el oligonucleótido de sentido: 5' gc gcc atg gat ctg gaa cag cgt agt cag cac tgc aag cct, y el oligonucleótido de sentido opuesto: 5' gcg tct aga tta atg gtg atg gtg atg gtg atg acc gcc ctc ttc ccc ctc tct caa); esta amplificación conduce a las modificaciones siguientes en el extremo N: cambio de los cinco primeros codones al uso del codón de *E. coli*, reemplazo del codón Pro mediante un codón de Asp en la posición 1, instalación de un sitio NcoI en la extremidad 5' y finalmente la adición de dos codones 2 Gly y el codón de 7 His seguido de un sitio XbaI en el extremo C.

b) - Clonación en el vector de clonación de TA de invitrogen del fragmento amplificado anteriormente y preparación del vector intermedio pRIT14647.

c) - Escisión del fragmento NcoI XbaI del plásmido pRIT14647 y clonación en el vector pRIT14586.

d) - Transformación de la cepa huésped AR58.

e) Selección y caracterización de los transformantes de la cepa de *E. coli* que contienen el plásmido pRIT 14477, que expresa la proteína de fusión LPD-MAGE-3-His.

Ejemplo II:

Preparación del antígeno LPD1/3 - MAGE - 3 His

1. Crecimiento e inducción de la cepa bacteriana - Expresión de LPD1/3 - MAGE - 3 - His:

Células de AR58 transformadas con plásmido pRIT14477 se desarrollaron en matraces de 2 litros, conteniendo cada uno 400 ml de medio LY12 suplementado con extracto de levadura (6,4 g/l) y sulfato de kanamicina (50 mg/l). Después de la incubación sobre una mesa en agitación a 30°C durante 8 +/- 1 h, se retiró una pequeña muestra de cada matraz para examen microscópico. El contenido de los dos matraces se reunió proporcionando el inóculo para el fermentador de 20 litros.

El inóculo (aproximadamente 800 ml) se añadió a un fermentador preesterilizado de 20 litros (volumen total) que contenía 7 litros de medio, suplementado con 50 mg/l de sulfato de kanamicina. El pH se ajustó y se mantuvo a 6,8 mediante la adición periódica de NH₄OH (25% v/v), y la temperatura se ajustó y se mantuvo a 30°C. La velocidad de aireación se ajustó y se mantuvo a 12 litros de aire/minuto y la tensión de oxígeno disuelto se mantuvo a 50 % de saturación mediante control por retroalimentación de la velocidad de agitación. La sobrepresión en el fermentador se mantuvo a 500 g/cm² (0,5 bares (50 kPa)).

El cultivo por lote de alimentación se llevó a cabo mediante la adición controlada de una solución de alimentación de carbono. La solución de alimentación se añadió a una velocidad inicial de 0,04 ml/min, y se incrementó de manera exponencial durante las primeras 42 horas para mantener una velocidad de crecimiento de $0,1 \text{ h}^{-1}$.

5 Después de 42 horas, la temperatura en el fermentador se incrementó rápidamente hasta 39°C , y la velocidad de alimentación se mantuvo constante a 0,005 ml/g DCW/min durante la fase de inducción durante 22 - 23 horas adicionales, tiempo durante el que la expresión intracelular de LPD-MAGE-3-His alcanzó un máximo nivel.

Se tomaron alícuotas (15 ml) de caldo a intervalos regulares a lo largo de las fases de crecimiento / inducción y al final de la fermentación para seguir la cinética de crecimiento microbiano y expresión del producto intracelular y además, proporcionando muestras para ensayos de identificación / pureza microbiana.

10 Al final de la fermentación, la densidad óptica del cultivo estaba entre 80 y 120 (correspondiente a una concentración de células de entre 48 y 72 g de DCW/L) y el volumen de líquido total era aproximadamente 12 litros. El cultivo se enfrió rápidamente hasta entre 6 y 10°C , y las células de ECK32 se separaron del caldo de cultivo mediante centrifugación a $5000 \times g$ a 4°C durante 30 minutos. Las células concentradas de ECK32 se almacenaron rápidamente en bolsas de plástico y se congelaron inmediatamente a -80°C .

15 **2. Extracción de la proteína:**

Las células concentradas congeladas de ECK32 se descongelaron hasta 4°C antes de que se volvieran a suspender en tampón de rompimiento de células hasta una densidad óptica final de 60 (que corresponde a una concentración de células de aproximadamente 36 g de DCW/L).

20 Las células se rompieron mediante dos pases mediante un homogeneizador de alta presión (1000 bares (100000 kPa)). La suspensión de células rotas se centrifugó ($\times 10000$ g a 4°C durante 30 minutos) y la fracción sedimentada se lavó dos veces con Triton x 100 (1% p/v) + EDTA (1 mM), seguido de un lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) + Tween 20 (0,1% v/v) y finalmente un lavado con PBS. Entre cada fase de lavado, la suspensión se centrifugó a $\times 10000$ g durante 30 minutos a 4°C , el sobrenadante se desechó y se retuvo la fracción sedimentada.

25 **Ejemplo III:**

Caracterización de la proteína de fusión Lipo D - MAGE 3:

1. Purificación:

LPD-MAGE-3-His se purificó del homogeneizado celular usando una secuencia de etapas descritas más adelante:

- a) Solubilización de la fracción sedimentada lavada del rompimiento celular,
- 30 b) reducción química de los enlaces disulfuro intra- e inter - proteína seguido de bloqueo de los grupos tiol para prevenir el reacomplamiento oxidante,
- c) microfiltración de la mezcla de reacción para la retirada de partículas y reducción de endotoxinas,
- d) captura y purificación primaria de LPD-MAGE-3-His mediante explotación de la interacción de afinidad entre la cola de polihistidina y Sepharose quelante cargada con cinc,
- 35 e) retirada de las proteínas contaminantes mediante cromatografía de intercambio aniónico.

La LPD-MAGE 3-His purificada se sometió a un número de fases de refinamiento:

- f) intercambio de tampón / retirada de urea mediante cromatografía de exclusión de tamaño usando Superdex 75,
- g) filtración en-proceso,
- 40 h) intercambio de tampón / desalación mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephadex G25.

Cada una de estas etapas se describe con más detalle más adelante:

1.1) - Solubilización del sedimento de homogeneizado de células.

45 La fracción sedimentada de la fase de lavado final (como se ha descrito anteriormente) se volvió a solubilizar durante toda una noche en 800 ml de una solución de clorhidrato de guanidina (6 M) y fosfato sódico (0,1 M, pH 7,0) a 4°C .

1.2) - Reducción y carboximetilación

El material solubilizado (una suspensión de color amarillo claro, turbio) se purgó con argón para depurar cualquier oxígeno restante, y se añadió una solución madre de 2-mercaptoetanol (14 M) para proporcionar una concentración final de 4,3 M (que corresponde a 0,44 ml de 2-mercaptoetanol por ml de solución).

50 La solución resultante se dividió y se transfirió en dos matraces de vidrio que se calentaron ambos hasta 95°C en un baño de agua. Después de 15 minutos a 95°C , se retiraron los matraces del baño de agua y se dejó enfriar, después el contenido se reunió en un recipiente cubierto con una hoja delgada (5 l), se colocó en hielo, y se añadió

5 yodoacetamida sólida con mezcla vigorosa proporcionando una concentración final de 6 M (que corresponde a 1,11 g de yodo acetamida por ml de solución). La mezcla se mantuvo en hielo en la oscuridad durante 1 hora para asegurar la completa solubilización de la yodo acetamida, antes de neutralizarse (manteniendo agitación vigorosa y control continuado de pH) mediante la adición de aproximadamente 1 l de hidróxido sódico (5 M) proporcionando un pH final de 7,5 - 7,8.

La mezcla resultante se mantuvo en hielo en la oscuridad durante 30 minutos adicionales, después de lo cual el pH se volvió a ajustar hasta pH de 7,5 - 7,8.

1.3) - Microfiltración

10 La mezcla se microfiltró en una unidad de flujo tangencial Amicon Proflux M12 equipada con un cartucho de fibra hueca Minikros (ref. N° M22M-600.01N; 5600 cm² de área, 0,2 µm). El permeato se retuvo para posterior purificación cromatográfica.

1.4) - Cromatografía por metales quelados (Zn⁺²) (IMAC)

15 La cromatografía por metales quelados se realizó con Sepharose quelante FF (Pharmacia Biotechnology N° de catálogo 17-0575-01) envasado en una columna BPG 100/500 (Pharmacia Biotechnology N° de catálogo 18-1103-01). Las dimensiones del lecho envasado eran: diámetro 10 cm; área de la sección transversal 79 cm²; altura del lecho 19 cm; volumen de envase 1500 ml. La columna vacía se sanitizó con hidróxido de sodio (0,5 M), después se lavó con agua purificada.

20 El soporte (distribuido en etanol al 20% v/v) se lavó con agua purificada (8 litros) sobre un embudo Buchner (a vacío) y se cargó con cinc pasando al menos 15 litros de una solución de ZnCl₂ (0,1 M). El exceso de cinc se retiró lavando el soporte con 10 litros de agua purificada, hasta que el pH del líquido de salida alcanzó el pH de la solución de ZnCl₂ (pH 5,0). Después el soporte se equilibró con 4 litros de una solución que contenía clorhidrato de guanidina (6 M) y fosfato sódico (0,1 M, pH 7,0).

25 El permeado de la microfiltración, que contenía LPD-MAGE-3 His, se mezcló con el soporte (unión de lote), antes de cargar y envasar la columna de BPG con la solución que contenía clorhidrato de guanidina (6 M) y fosfato sódico (0,1 M, pH 7,0).

Las fases siguientes de cromatografía por metal quelado se llevaron a cabo a un caudal de eluyente de 60 ml/min. La columna se lavó, primero con la solución que contenía clorhidrato de guanidina (6 M) y fosfato sódico (0,1 M, pH 7,0), después con la solución que contenía urea (6 M) y fosfato sódico (0,1 M, pH 7,0), hasta que el eluyente de la columna alcanzó absorbancia cero a DO_{280 nm} (línea base).

30 La fracción de proteína semipura de LPD-MAGE-3-His se eluyó con 2 volúmenes de columna de una solución que contenía urea (6 M), fosfato sódico (0,1 M, pH 7,0) e imidazol (0,5 M). La conductancia de esta fracción era aproximadamente 16 mS/cm.

1.5) Cromatografía de intercambio aniónico

35 Antes de continuar con la cromatografía de intercambio aniónico, la conductancia de la fracción de proteína semipura de LPD-MAGE-3-His se redujo hasta aproximadamente 4 mS/cm mediante dilución con una solución que contiene urea (6 M) y Tris-HCl (20 mM, pH 8,0).

40 La cromatografía de intercambio aniónico se realizó usando Q-Sepharose FF (Pharmacia Biotechnology, n° de catálogo 17-0510-01) envasada en una columna BPG 200/500 (Pharmacia Biotechnology, n° de catálogo 18-1103-11). Las dimensiones del lecho envasado eran: diámetro 10 cm; área de la sección transversal 314 cm²; altura del lecho 9 cm; volumen de envase 2.900 ml.

45 La columna se envasó (con etanol al 20% v/v) y se lavó con 9 litros de agua purificada a un caudal de eluyente de 70 ml/min. La columna envasada se sanitizó con 3 litros de hidróxido de sodio (0,5 M), se lavó con 30 litros de agua purificada, después se equilibró con 6 litros de una solución que contenía urea (6 M) y Tris - HCl (20 mM, pH 8,0). La LPD-MAGE-3-His diluida, semipurificada se cargó en la columna y después se lavó con 9 litros de una solución que contenía urea (6 M), Tris - HCl (20 mM, pH 8,0), EDTA (1 mM) y Tween (0,1%), hasta que la absorbancia (280 nm) del eluyente caía hasta cero.

Se realizó una etapa de lavado adicional con 6 litros de una solución que contenía urea (6 M) y Tris - HCl (20 mM, pH 8,0).

50 La LPD-MAGE-3-His purificada se eluyó de la columna con una solución que contenía urea (6 M), Tris - HCl (20 mM, pH 8,0) y NaCl (0,25 M).

1.6) - Cromatografía por exclusión de tamaño

55 La retirada de urea de la LPD-MAGE-3-His purificada y el intercambio de tampón se lograron ambos mediante cromatografía por exclusión de tamaño. Esto se realizó usando Superdex 75 (Pharmacia Biotechnology n° de catálogo 17-1044-01) envasada en una columna XK 50/100 (Pharmacia Biotechnology n° de catálogo 18-8753-01) Las dimensiones del lecho envasado eran: diámetro 5 cm; área de la sección transversal 19,6 cm²; altura del lecho 90 cm; volumen envasado 1.800 ml.

La columna se envasó en etanol (20%) y se lavó con 5 litros de agua purificada a un caudal de eluyente de 20 ml/min. La columna se sanitizó con 2 litros de hidróxido sódico (0,5 M), se lavó con 5 litros de agua purificada, después se equilibró con 5 litros de solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 (0,1% v/v).

La fracción de LPD-MAGE-3-His purificada (máximo 500 ml / desarrollo de desalado) se cargó en una columna a un caudal de eluyente de 20 ml/min. La LPD-MAGE-3-His purificada desalada se eluyó de la columna con 3 litros de PBS que contenía Tween 80 (0,1% v/v).

La fracción que contenía LPD-MAGE-3-His se eluyó hasta el volumen de vaciado de la columna.

5 1.7) - Filtración en proceso

La LPD-MAGE-3-His a granel de la cromatografía de exclusión por tamaño se filtró a través de una membrana de 0,22 µm en una campana de flujo laminar (clase 10.000). El volumen filtrado se congeló hasta -80°C y se almacenó hasta la etapa de desalación.

1.8) - Cromatografía de desalación

10 Ya que la osmolalidad del volumen final debe ser menor que 400 mOsm, se requería una etapa de intercambio de tampón adicional para reducir la concentración de sal. Esto se realizó mediante una etapa de cromatografía de desalación usando Sephadex G25 (Pharmacia Biotechnology nº de catálogo 17-0033-02) envasada en una columna BPG 100/950 (Pharmacia Biotechnology nº de catálogo 18-1103-03). Las dimensiones del lecho envasado eran: diámetro 10 cm; área de la sección transversal 78,6 cm²; altura del lecho 85 cm; volumen envasado 6.500 ml.

15 El Sephadex G25 se hidrató con 7 litros de agua purificada y se dejó hinchar durante toda una noche a 4°C. El gel se envasó después en la columna con agua pura a un caudal de eluyente de 100 ml/min.

La columna se sanitizó con 6 litros de hidróxido sódico (0,5 M), después se equilibró con 10 litros de una solución que contenía fosfato sódico (10 mM, pH 6,8), NaCl (20 mM) y Tween 80 (0,1% v/v).

20 La fracción de LPD-MAGE-3-His purificada (máximo 1500 ml/desarrollo de desalación) se cargó en la columna a un caudal de eluyente de 100 ml/min. La fracción de LPD-MAGE-3-His purificada desalada eluida hasta el volumen de vaciado de la columna, se filtró de manera estéril a través de una membrana de 0,22 µm y se almacenó a -80°C.

La proteína a granel final se descongeló hasta +4°C antes de que se tomaran alícuotas en viales y se secaron por congelación en un excipiente de lactosa (3,2%).

2. Análisis en geles de SDS - poliacrilamida teñidos con Coomassie

25 El antígeno de LPD-MAGE-3-His purificado se analizó mediante SDS - PAGE sobre un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones reductoras.

30 La carga de proteína era 50 µg para la tinción de azul Coomassie y 5 µg para la tinción por nitrato de plata. Se analizaron el lote clínico 96K19 y el lote piloto 96J22. Se visualizó una banda principal correspondiente a un peso molecular de 60kDa. También se observaron dos bandas adicionales menores de aproximadamente 45 kDa y 35 kDa.

3. Análisis de transferencia de Western:

35 Los péptidos revelados mediante análisis de SDS - PAGE de la proteína LPD-MAGE-3-His se identificaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales de ratón. Estos anticuerpos se desarrollaron en casa usando una preparación purificada de la proteína MAGE-3-His (esta proteína no contiene la parte LPD de la LPD-MAGE-3-His).

40 Se han seleccionado dos preparaciones de anticuerpos monoclonales (Mab 22 y Mab 54) en base a la conveniencia para análisis por transferencia de Western y se usaron en el ensayo de identidad para la liberación del lote. La figura 4 muestra los patrones de banda obtenidos para los lotes 96K19 y 96J22 después de la tinción con Mabs 32 y 54. Se resolvieron seiscientos (600) ng de la proteína sobre un SDS - PAGE al 12,5%, se transfirieron a una membrana de nylon, se hicieron reaccionar con Mabs 32 y 54 (60 µg/ml) y se revelaron con anticuerpos anti - ratón acoplados a peroxidasa.

Los péptidos de 60 kDa y 30 kDa detectados mediante SDS - PAGE se revelaron mediante ambos Mabs.

Ejemplo IV:

1. Preparación de vacunas usando proteína LPD-MAGE-3-His:

45 La vacuna usada en estos experimentos se produce a partir de un ADN recombinante, que codifica una lipoproteína D 1/3-MAGE-3-His, expresada en E. coli a partir de la cepa AR58, o bien adyuvantada o no. Como un adyuvante, la formulación comprende una mezcla de 3 des-O-acilado monofosforil lípido A (3D-MPL) y QS21 en una emulsión aceite / agua. El sistema adyuvante SBAS2 se ha descrito previamente en el documento WO 95/17210.

50 **3D-MPL:** es un inmunoestimulante derivado del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria Gram negativa *Salmonella minnesota*. MPL se ha desacilado y carece de un grupo fosfato del resto del lípido A. El tratamiento químico reduce notablemente la toxicidad mientras que preserva las propiedades inmunoestimulantes (Ribi, 1986). La inmunoquímica Ribi produce y suministra MPL a SB-Biologicals. Los experimentos realizados en Smith Kline Beecham Biologicals han mostrado que 3D-MPL combinada con diversos vehículos potencia fuertemente tanto el tipo humoral como el tipo TH1 de la inmunidad celular.

55 **QS21:** es una molécula de saponina natural extraída de la corteza del árbol de Sur América Quillaja saponaria Molina. Una técnica de purificación desarrollada para separar las saponinas individuales a partir de los extractos

brutos de la corteza, permitió el aislamiento de la saponina particular. QS21, que es un glicósido de triterpeno que demuestra actividad adyuvante más fuerte y menor toxicidad cuando se compara con el componente precursor. QS21 se ha mostrado que activa las CTL restringida de clase I MHC a varias subunidades Ags, así como que estimula la proliferación linfocítica específica de Ag (Kensil, 1992). Aquila (formalmente Cambridge Biotech Corporation) produce y suministra QS21 a SB-Biologicals.

Los experimentos realizados en SmithKline Beecham Biologicals han demostrado un claro efecto sinérgico de las combinaciones de MPL y QS21 en la producción de respuestas inmunes celulares tanto humorales como de tipo TH1.

La emulsión de aceite / agua se compone de una fase orgánica hecha de 2 aceites (un tocoferol y un escualeno), y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como emulsionante. La emulsión comprendía 5% de escualeno 5% de tocoferol 0,4% de Tween 80 y tenía un tamaño medio de partícula de 180 nm y se conoce como SB62 (véase el documento WO 95/17210).

Los experimentos realizados en SmithKline Beecham Biologicals han probado que la adjucción de esta emulsión ac / ag a 3D-MPL/QS21 (SBAS2) incrementa adicionalmente las propiedades inmunoestimulantes de esta última contra diversas subunidades de antígenos.

2. Preparación de la emulsión SB62 (2 veces concentradas):

Se disuelve Tween 80 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) proporcionando una solución al 2% en la PBS. Para proporcionar 100 ml de la emulsión concentrada dos veces 5 g de DL alfa tocoferol y 5 ml de escualeno se agitaron en un aparato vortex para mezclar completamente. Se añaden 90 ml de solución PBS/Tween y se mezcla concienzudamente. La emulsión resultante se pasa después a través de una jeringa y finalmente se microfluidifica usando una máquina de microfluidificación M110S. Las gotas de aceite resultante tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

3. Preparación de formulación de aceite en agua Lipoprot. D1/3 - MAGE-3-His QS21/3D MPL (SBAS2):

El adyuvante se formula en forma de una combinación de MPL y QS21, en una emulsión aceite / agua. Esta preparación se distribuye en viales de 0,7 ml a mezclar con el antígeno liofilizado (viales que contienen entre 30 y 300 µg de antígeno).

La composición del diluyente de adyuvante para la vacuna liofilizada es como sigue:

Ingredientes:	Cantidad (por dosis):
<u>Adyuvantes</u>	
Emulsión Sb62:	250 µl
-Escualeno	10,7 mg
- DL α-tocoferol	11,9 mg
- Tween 80	4,8 mg
Monofosforil lípido A	100 µg
QS21	100 µg
<u>Conservante</u>	
Tiomersal	25 µg
<u>Tampón</u>	
Agua para inyección	c. s. ajust 0,5 ml
- Fosfato sódico dibásico	575 µg
- Fosfato potásico monobásico	100 µg
- Cloruro potásico	100 µg
- Cloruro sódico	4,0 mg

La vacuna final se obtiene después de reconstitución de la preparación de LPD-MAGE-3-His liofilizada con el adyuvante o con PBS solo.

Los controles de adyuvantes sin antígeno se prepararon reemplazando la proteína por PBS.

4. Antígeno de vacuna: proteína de fusión lipoproteína D1/3 - MAGE-3His

La lipoproteína D es una lipoproteína expuesta sobre la superficie de la bacteria Gram - negativa *Haemophilus influenzae*.

La inclusión de los primeros 109 restos de la proteína D procesada como pareja de fusión se incorpora para

proporcionar el antígeno de vacuna con epítopes de células T. Además del resto LPD, la proteína contiene dos aminoácidos no relacionados (Met y Asp), restos de aminoácidos 2 a 314 de Mage-3, dos residuos Gly que funcionan como región bisagra para exponer los siete residuos His posteriores.

Ejemplo V:

5 1. Inmunogenicidad de LPD-MAGE-3-His en ratones y monos:

Con el fin de ensayar la antigenicidad e inmunogenicidad de la proteína MAGE-3 humana, la vacuna candidata se inyectó en 2 cepas diferentes de ratones (C57BL/6 y Balb/C), variando en sus antecedentes genéticos y alelos MHC. Para ambas cepas de ratones, los motivos de péptido MHC clase - I y MHC clase - II se predijeron teóricamente para la parte MAGE de la proteína de fusión LPD-MAGE-3-His.

10 a) - Protocolo de inmunización:

5 ratones de cada raza se inyectaron dos veces a intervalos de dos semanas en la almohadilla de la pata con 5 µg de LPD-MAGE-3-His, formulada o no en SBAS2 a 1/10 de la concentración usada en las situaciones humanas.

b) - Ensayo de proliferación:

15 Los linfocitos se prepararon aplastando el bazo o los ganglios linfáticos poplíteos de los ratones, 2 semanas después de la última inyección. Se colocaron 2×10^5 células por triplicado en placas de 96 pocillos y las células se volvieron a estimular *in vitro* durante 72 horas con diferentes concentraciones (1 - 0,1 µg/ml) de His-MAGE 3 como tal o revestidas en microperlas de látex.

20 Se observó un incremento de la actividad linfoproliferativa específica de MAGE-3 tanto con células de bazo (figuras 5 y 7) como con células de ganglios linfáticos (véanse las figuras 6 y 8) a partir de ratones o bien C57BL/6 o Balb/C inyectados con la proteína LPD-MAGE-3-His, cuando se compara con la respuesta linfoproliferativa de ratones que recibían la formulación SBAS-2 sola o PBS.

Además, una respuesta proliferativa mayor se obtuvo con linfocitos de ratones inmunizados con LPD-MAGE-3-His en el adyuvante SBAS2 (véanse las figuras 6 y 8).

c) - Conclusión:

25 LPD-MAGE-3-His es inmunogénica en ratones, y esta inmunogenicidad se puede incrementar mediante el uso de la formulación de adyuvante SBAS2.

2. Respuesta de anticuerpos:

a) - Protocolo de inmunización:

30 Ratones C57BL/6 o Balb/C se inmunizaron mediante 2 inyecciones dentro de la almohadilla de la pata a intervalos de dos semanas con o bien PBS, o SBAS2, o 5 µg de LPD-MAGE-3-His, o 5 µg de LPD-MAGE-3-His + SBAS2.

Se usaron tres y cinco animales en los grupos de control y en los grupos ensayados respectivamente.

b) - ELISA indirecto:

Dos semanas después de la segunda inyección, se tomaron sueros individuales y se sometieron a un ELISA indirecto.

35 2 µg/ml de His MAGE 3 purificada se usó como antígeno revestido. Después de la saturación durante 1 hora a 37°C, en PBS + suero de ternera recién nacida al 1%, los sueros se diluyeron en serie (partiendo a 1/1000) en el tampón de saturación y se incubaron durante toda una noche a 4°C, o 90 minutos a 37°C. Después de lavar en PBS/Tween 20,0,1%, se usaron antisueros de IgG total anti ratón de cabra biotinilado (1/1000) o IgG1, IgG2a, IgG2b de anti - ratón de cabra (1/5000) como anticuerpos secundarios. Después de 90 minutos la incubación a 37°C. Se añadió estreptavidina acoplada a peroxidasa, y se usó TMB (peróxido de tetra-metil-bencidina) como sustrato. Después de **40** 10 minutos, la reacción se bloqueó mediante la adición de H₂SO₄ 0,5 M, y se determinó la D. O.

c) - Resultados:

La figura 9 compara entre los diferentes grupos de ratones (N = 5/grupo), la titulación media del punto medio relativo de los sueros, que consiste en la dilución media necesaria para alcanzar el punto medio de las curvas.

45 Estos resultados muestran que en ambas cepas de ratones ensayadas, se observó una respuesta débil de Ab después de 2 inyecciones de LPD-MAGE-3-His sola, pero se generaron concentraciones mayores de Ab anti-MAGE 3 cuando se inyecta LPD-MAGE-3-His en presencia de SBAS2. De esta manera, solamente dos inyecciones de LPD-MAGE-3-His + SBAS2, a intervalos de 2 semanas, son suficientes para generar la respuesta alta de Ab observada.

50 La mejor respuesta de Ab observada en los ratones Balb/c cuando se compara con la respuesta obtenida en los ratones C57BL/6 se puede explicar mediante diferencias en haplotipos o en antecedentes entre estas 2 razas, incluso aunque la valoración de Ab en ratones C57BL/6 es también mayor después de inyecciones de LPD-MAGE-3-His + SBAS2 que después de inyecciones con LPD-MAGE-3-His sola.

Las respuestas de anti-MAGE-3 específica de las subclases de Ig después de vacunaciones en los diferentes

grupos de ratones se puede observar en las figuras 10 y 11, que proporcionan una comparación de la dilución media del punto medio del suero.

Ni IgA, ni IgM se detectaron en ninguna de las muestras de suero incluso de los ratones vacunados con LPD-MAGE-3-His en el adyuvante SBAS2.

- 5 Por el contrario, el nivel de IgG total era ligeramente mayor en los sueros de ratones vacunados con LPD-MAGE-3-His sola, y aumentaba significativamente en el suero de animales inyectados con LPD-MAGE-3-His en SBAS2.

El análisis de las concentraciones diferentes de subclases IgG muestran que se indujo respuesta de Ab mixta en los ratones, ya que los niveles de todas las subclases de IgG ensayadas (IgG1, IgG2a, IgG2b) eran mayores en ratones vacunados con Ag adyuvantada que en ratones inyectados con la Ag o el adyuvante solo.

- 10 La naturaleza de esta respuesta de Ab mixta con LipoD-MAGE-3 en presencia de SBAS2 parece sin embargo depender de la cepa de ratón, ya que IgG1 e IgG2b se encontraron predominantemente en el suero de ratones Balb/c y C57BL/6 respectivamente.

3. Inmunogenicidad de Lipoproteína D 1/3 MAGE-3-His + adyuvante SBAS2 en monos Rhesus:

- 15 Se seleccionaron tres grupos de cinco animales Rhesus (*Macaca mulatta*). RTS,S y gp 120 se usaron como control positivo.

Grupos:

Grupo 1 pata derecha: RTS,S/SBAS2
pata izquierda: GP120/SBAS2

- 20 Grupo 2 pata derecha: RTS,S/SB26T
pata izquierda: GP120/SB26T

Grupo 3 pierna derecha: LipoD 1/3 Mage 3 His/SBAS2

- 25 Los animales recibieron vacuna el día 0 y se reinmunizaron los días 28, y 84 y se extrajo sangre para determinar su respuesta de anticuerpo para tanto MAGE 3 como el componente de la proteína D. Las vacunas se administraron por vía intramuscular como una inyección de bolo (0,5 ml) en la parte posterior de la pierna derecha.

Se tomaron pequeñas muestras de sangre cada 14 días. Se recogieron muestras de sangre no heparinizada de 3 ml de la vena femoral, se dejaron coagular durante al menos 1 hora y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 minutos a 2500 rpm.

- 30 Se retiró suero, se congeló a -20°C y se envió para determinación de los niveles de anticuerpo mediante Elisa específico.

- 35 Se revistieron placas de 96 pocillos (maxisorb Nunc) o bien con 5 µg de His Mage 3 o Proteína D durante toda una noche a 4°C. Después de 1 hora de saturación a 37°C con PBS NCS 1%, se añadieron diluciones en serie del suero de conejo durante 1 h 30 min. a 37°C (partiendo de 1/10), después de 3 lavados en PBS Tween, se añadió suero biotinilado anti conejo (Amerham ref RPN 1004 lote 88) (1/5000). Las placas se lavaron y se añadió estreptavidina acoplada a peroxidasa (1/5000) durante 30 minutos a 37°C. Después de lavar, se añadieron 50 µl de TMB (BioRad) durante 7 minutos y se detuvo la reacción con H₂SO₄ 0,2 M, se midió la DO a 450 nm. Las diluciones de punto medio se calcularon mediante SoftmaxPro.

Respuesta de anticuerpos:

- 40 Se tomaron muestras pequeñas de sangre cada 14 días para seguir la cinética de la respuesta de anticuerpos a Mage 3 mediante ELISA. Los resultados indican que después de una inyección de LPD1/3 Mage 3 His + SBAS2, la valoración de Ig total específica de Mage 3 era baja, se observó un estímulo claro en 3 de los 5 animales después de una segunda y tercera inyección de LipoD1/3 Mage 3 + adyuvante en los mismos monos. Los respondedores pobres permanecían negativos después de 3 inyecciones. 28 días después de II o después de III, las valoraciones de anticuerpos han retornado a los niveles basales. La subclase de estos anticuerpos se determinó como IgG predominantemente y no IgM. El cambio a IgG sugiere que se ha desencadenado una respuesta de auxiliar T. La respuesta de anticuerpo específica de la proteína D, aunque más débil, es exactamente paralela a la respuesta de anticuerpo Mage 3.

Ejemplo VI:

- 50 1. **LPD - MAGE 1 His**

Se preparó LPD - MAGE 1 His de una manera análoga. Las secuencias de aminoácidos y ADN se muestran en las SECUENCIAS ID números 3 y 4. La proteína resultante se purificó de una manera análoga a la proteína LPD-MAGE-3-His. En resumen, el cultivo celular se homogeneizó y se trató con guanidina HCl 4 M y beta mercaptoetanol 0,5 M en presencia de detergente Empigen al 0,5%. El producto se filtró y se trató el permeado con yodo acetamida

0,6 M. Las fracciones carboxiamidadas se sometieron a cromatografía IMAC (quelato de cinc - sepharose FF). Primero la columna se equilibró y se lavó con una solución que contenía guanidina 4 M, HCl y fosfato sódico (20 mM, pH 7,5) y Empigen al 0,5%, después la columna se lavó con una solución que contenía urea 4 M en fosfato sódico (20 mM, pH 7,5) 0,5 % de tampón Empigen. La proteína se eluyó en el mismo tampón, pero con concentración creciente de Imidazol (20 mM, 400 mM y 500 mM).

El eluato se diluyó con urea 4 M. La columna de Q-sepharose se equilibró y se lavó con urea 4 M en tampón fosfato 20 mM (pH 7,5) en presencia de Empigen al 0,5%. Se realizó un segundo lavado en el mismo tampón, pero desprovisto de detergente. La proteína se eluyó en el mismo tampón pero con Imidazol creciente (150 mM, 400 mM, 1 M). El eluato se ultra filtró.

10 **Ejemplo VII:**

Construcción del plásmido de expresión pRIT14426 y transformación de la cepa huésped AR58 para producir NS1 - MAGE - 3 His:

Diseño de proteína:

El diseño de la proteína de fusión NS1, -MAGE-3-His a expresar en E. coli se describe en la figura 12.

15 La estructura primaria de la proteína resultante tiene la secuencia expuesta en ID N° 5.

La secuencia codificadora (ID N° 6) correspondiente al diseño de proteína anterior se colocó bajo el control del promotor λ pL en un plásmido de expresión de E. coli.

La estrategia de clonación para la generación de la proteína de fusión NS₁-MAGE-3-His:

20 El material de partida era un plásmido de ADNc recibido del Dr Thierry Boon del Instituto Ludwig, que contiene la secuencia codificadora para el gen MAGE-3 y el vector PMG81, que contiene los 81 aa de la región codificadora de NS₁ (proteína no estructural) de Influenza.

La estrategia de clonación esquematizada en la figura 13 incluía las siguientes etapas:

25 a) amplificación de PCR de las secuencias presentadas en el plásmido MAGE-3 del ADNc usando el oligonucleótido de sentido: 5' gc gcc atg gat ctg gaa cag cgt agt cag cac tgc aag cct, y el oligonucleótido de sentido opuesto: 5' gcg tct aga tta atg gtg atg gtg atg acc gcc ctc ttc ccc ctc tct caa.

Esta amplificación conduce a las siguientes modificaciones en el extremo N: cambiando los cinco primeros codones al uso del codón de E. coli, reemplazo del codón Pro por un codón Asp en la posición 1, la instalación de un sitio NcoI en el extremo 5' y finalmente la adición de los 2 codones Gly y el codón 7 His seguido de un sitio XbaI en el extremo C.

30 b) Clonación en el vector de clonación TA de invitrogen del fragmento amplificado anterior y preparación del vector intermedio pRIT14647

c) Escisión del fragmento NcoI XbaI del plásmido pRIT14647 y clonación en el vector pRIT PMG81

d) transformación de la cepa huésped AR58

35 e) selección y caracterización de los transformantes de la cepa de E. coli que contienen el plásmido pRIT14426 (véase la figura 14) que expresa la proteína de fusión NS₁-MAGE-3-His

Caracterización del recombinante NS₁-MAGE-3-His (pRIT14426):

Se desarrollaron bacterias sobre el medio LB suplementado con 50 μ g/ml de kanamicina a 30°C. Cuando el cultivo había alcanzado la DO = 0,3 (a 620 nm), la inducción por calor se logró elevando la temperatura hasta 42°C.

40 Después de 4 horas de inducción, se recogieron las células, se volvieron a suspender en PBS y se lisaron (mediante disgregación) presionando tres veces en la prensa francesa. Después de centrifugación (60 minutos a 100.000 g), el sobrenadante sedimentado y el extracto total se analizaron mediante SDS - PAGE. Las proteínas se visualizaron en geles teñidos con Coomassie B1 donde las proteínas de fusión representaban aproximadamente 1% de las proteínas totales de E. coli. La proteína recombinante aparecía en una sola banda con un peso molecular aparente de 44,9 K. La proteína de fusión se identificó mediante análisis de transferencia de Western usando anti - NS₁ monoclonal.

Ejemplo VIII

La purificación de NS₁-MAGE 3-His (E. coli) para inmunización de conejo / ratón.

Esquema de purificación:

Se usó el siguiente esquema de purificación para purificar el antígeno:

50 Lisis de células + centrifugación

↓

Solubilización de antígeno + centrifugación

↓

Ni²⁺ + -NTA agarosa

↓

5 Concentración

↓

Célula prep.

↓

Precipitación de TCA y solubilización en PBS

10 a. Lisis

Se lisaron células bacterianas (23 g) en 203 ml de un tampón de PO₄ pH 7 50 mM mediante Rannie (homogeneizador) y el lisado se centrifugó en un rotor JA 20 a 15.000 rpm durante 30 minutos.

Se desechó el sobrenadante.

b. Solubilización de antígeno

15 1/3 del sedimento se volvió a solubilizar en O/N a 4°C en 34 ml de PO₄ 100 mM GuHCl 6 M pH 7. Después de la centrifugación en un rotor JA 20 a 15.000 rpm durante 30 minutos, el sedimento se desechó y el sobrenadante se purificó adicionalmente mediante IMAC.

c. Cromatografía de afinidad: Ni²⁺ + -NTA agarosa (Qiagen)

Volumen de columna: 15 ml (16 mm x 7,5 cm)

20 Tampón de envasado: PO₄ 0,1 M - GuHCl 6 M pH 7

Tampón de muestra: idem

Tampón de lavado: PO₄ 0,1 M - GuHCl 6 M pH 7

PO₄ 0,1 M - urea 6 M pH 7

Elución: gradiente de imidazol (0 → 250 mM) en tampón PO₄ 0,1 M pH 7 suplementado con urea 6 M.

25 Caudal: 2 ml/min

a. Concentración:

Fracciones positivas de antígeno del eluato IMAC (160 ml) se reunieron y se concentraron hasta 5 ml en una celda agitada por Amicon sobre una membrana Filtron (tipo Omega corte 10.000). La pureza a esta fase es aproximadamente 70% como se estima por SDS-PAGE.

30 b. Electroforesis preparativa (prep. Cell Biorad)

2,4 ml de la muestra concentrada se sometió a ebullición en 0,8 ml de tampón de muestra reductora y se cargó en un gel de acrilamida al 10%. El antígeno se eluyó en un tampón Tris - glicina pH 8,3 suplementado con SDS al 4% y se reunieron fracciones positivas de Ns₁ - MAGE 3 His.

a. Precipitación de TCA:

35 El antígeno se precipitó por TCA y después de la centrifugación en un rotor JA 20 a 15.000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se desechó. El sedimento se volvió a solubilizar en tampón PBS pH 7,4.

La proteína es soluble en PBS después de que la congelación / descongelación no muestra ninguna degradación cuando se almacena durante 3 horas a 37°C y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 50.000 Daltons como se determina por SDS (12,5% de PAGE).

40 **Ejemplo IX:**

Preparación de la cepa de E. coli que expresa una proteína de fusión CLYTA - MAGE - 1 - cola His

1. Construcción del plásmido de expresión pRIT14613 y transformación de la cepa huésped AR58:

Diseño de proteína:

El diseño de la proteína de fusión Clyta-Mage-1-His a expresar en E. coli se describe en la figura 15.

La estructura primaria de la proteína resultante tiene la secuencia expuesta en la secuencia ID N° 7.

La secuencia codificadora (véase la SECUENCIA ID N° 8) correspondiente al diseño de proteína anterior de colocó bajo el control del promotor λ pL en un plásmido de expresión de *E. coli*.

Clonación:

- 5 El material de partida era el **vector PCUZ1** que contiene los 117 codones C terminales de la región codificadora de LytA de *Streptococcus pneumoniae* y el **vector pRIT14518**, en el que previamente se había subclonado el ADNc del gen MAGE-1 de un plásmido recibido del Dr Thierry Boon del instituto Ludwig.

La estrategia de clonación para la expresión de la proteína CLYTA-Mage-1-His (véase el esquema de la figura 16) incluía las siguientes etapas:

10 **2. Preparación del módulo de la secuencia codificadora CLYTA-Mage-1-His:**

- a) La primera etapa era una amplificación de PCR, destinada a flanquear las secuencias de CLYTA con los sitios de restricción NdeI-AflIII. La amplificación de PCR se realizó usando el plásmido PCUZ1 como molde y como cebadores el oligonucleótido de sentido: 5' tta aac cac acc tta agg agg ata taa cat atg aaa ggg gga att gta cat tca gac, y el oligonucleótido de sentido opuesto: 5' GCC AGA CAT GTC CAA TTC TGG CCT GTC TGC CAG. Esto conduce a la amplificación de una secuencia de CLYTA de 378 nucleótidos.

- b) La segunda etapa era la unión de las secuencias de CLYTA a las secuencias MAGE-1-His, para generar la secuencia codificadora para la proteína de fusión. Esta etapa incluía la escisión de un fragmento NdeI-AflIII Clyta e inserción en el vector pRIT14518 abierto previamente mediante las enzimas de restricción NdeI y NcoI (NcoI y AflIII compatible) y dio lugar al plásmido pRIT14613.

- c) Transformación de la cepa huésped AR58

- d) Selección y caracterización del transformante de *E. coli* (resistente a KAN) que contiene el plásmido pRIT14613. (Véase la figura 16).

1. Caracterización de la proteína recombinante CLYTA- MAGE-1-His (pRIT14613):

- 25 Las bacterias se desarrollaron en un medio LB suplementado con 50 μ g/ml de kanamicina a 30°C. Cuando el cultivo había alcanzado una DO = 0,3 (a 620 nm), la inducción por calor se logró elevando la temperatura a 38°C.

- Después de 4 horas de inducción, las células se recogieron, se volvieron a suspender en PBS y se lisaron (mediante disgregación) por un disparo. Después de la centrifugación, el sobrenadante sedimentado y extracto total se analizaron mediante SDS - PAGE. Las proteínas se visualizaron en geles teñidos por Coomassie B1, cuando la proteína de fusión representaba aproximadamente el 1% de las proteínas totales de *E. coli*. La proteína recombinante aparecía en una sola banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 49 kD. La proteína de fusión se identificó mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpos policlonales anti-Mage-1.

Reconstitución de la unidad de expresión compuesta por el promotor λ pL largo (útil para la inducción con ácido nalidíxico) y la secuencia codificadora CLYTA-Mage-1 pRIT146614):

- 35 Un fragmento de restricción EcoRI-NCO₁ que contiene el promotor pL largo y una parte de las secuencias CLYTA se preparó a partir del plásmido pRIT DVA6 y se insertó entre los sitios EcoRI-NCO₁ del plásmido pRIT14613.

Se obtuvo el plásmido recombinante pRIT14614.

El plásmido recombinante pRIT14614 (véase la figura 17) que codifica la proteína de fusión CLYTA-Mage-1-His se usó para transformar AR120 de *E. coli*. Se seleccionó y se caracterizó una cepa candidata resistente a Kan.

Caracterización de la proteína recombinante:

- 40 Se desarrollaron bacterias en medio Lb suplementado con 50 mg/ml de kanamicina a 30°C. Cuando el cultivo había alcanzado una DO = 400 (a 620 nm) se añadió ácido nalidíxico hasta una concentración final de 60 mg/ml.

- Después de 4 horas de inducción, se recogieron las células, se volvieron a suspender en PBS y se lisaron mediante disgregación (tipo de "un disparo" de CLS de disgregación). Después de la centrifugación, el sobrenadante sedimentado y el extracto total se analizaron mediante SDS - PAGE. Las proteínas se visualizaron en geles teñidos por azul Comassie, cuando la proteína de fusión representaba aproximadamente 1% de las proteínas totales de *E. coli*. La proteína de fusión se identificó mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpos policlonales anti - Mage-1 de conejo. La proteína recombinante aparecía como una sola banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 49 kD.

Ejemplo X:

50 **CLYTA - MAGE-3-HIS**

A: Antígeno recombinante de rechazo de tumores: una proteína de fusión CLYTA-Mage-3-His cuando la pareja de fusión de C-lyt A condujo a la expresión de una proteína soluble, actúa como marca de afinidad y proporciona un auxiliar T útil.

Preparación de la cepa de *E. coli* que expresa una proteína de fusión CLYTA - MAGE-3-cola His

Construcción del plásmido de expresión pRIT14646 y transformación de la cepa huésped AR 120:

Diseño de proteína:

El diseño de la proteína de fusión Clyta-Mage-3-His a expresar en *E. coli* se describe en la figura 18.

5 La estructura primaria de la proteína resultante tiene la secuencia descrita en la SECUENCIA ID nº 9 y la secuencia codificadora en la secuencia ID Nº 10.

La secuencia codificadora correspondiente al diseño de proteína anterior se colocó bajo el control del promotor λ pL en un plásmido de expresión de *E. coli*.

Clonación:

10 El material de partida era el **vector PCUZ1** que contiene los 117 codones C terminales de la región que codifica LytA de *Streptococcus pneumoniae*, descrita en Gene 43, (1986) p. 265 - 272 y el **vector pRIT14426**, en el que los inventores han subclonado previamente el ADNc del gen de MAGE-3 a partir de un plásmido recibido del Dr. Thierry Boon del Instituto Ludwig.

La estrategia de clonación para la expresión de la proteína CLYTA- MAGE-3-His (véase el esquema en figura 19) incluía las siguientes etapas

15 **1 - Preparación del módulo de la secuencia codificadora CLYTA- MAGE-3-His**

1.1 La primera etapa era una amplificación de PCR, destinada a flanquear las secuencias CLYTA con los sitios de restricción AflII y AflIII. La amplificación de PCR se realizó usando el plásmido PCUZ1 como molde y como cebadores el oligonucleótido de sentido: 5' tta aac cac acc tta agg agg ata taa cat atg aaa ggg gga att gta cat tca gac, y el oligonucleótido de sentido opuesto: 5' ccc aca tgt cca gac tgc tgg cca att ctg gcc tgt ctg cca gtg. Esto conduce a la amplificación de una secuencia CLYTA de 427 nucleótidos de longitud. El fragmento amplificado anteriormente se clonó en el vector de clonación TA de Invitrogen para conseguir el vector intermedio pRIT14661.

1.2 La segunda etapa era la unión de las secuencias CLYTA a las secuencias MAGE-3-His, para generar la secuencia codificadora para la proteína de fusión. Esta etapa incluye la escisión de un fragmento AflII-AflIII Clyta e inserción en el vector pRIT14426 abierto previamente mediante las enzimas de restricción AflII y NcoI (NcoI y AflIII compatible) y dio lugar al plásmido pRIT14662.

2. Reconstitución de la unidad de expresión compuesta por el promotor λ pL largo (útil para inducción por ácido nalidixico) y la secuencia codificadora CLYTA-Mage-3:

30 Un fragmento de restricción BgIII - XbaI que contenía el promotor pL corto y las secuencias codificadoras CLYTA-Mage-3-His se preparó a partir del plásmido pRIT14662, y se insertó entre los sitios BgIII - XbaI del plásmido TCM67 (un derivado de pBR322 que contiene la resistencia a ampicilina, y el promotor λ pL largo, descrito en la solicitud internacional PCT/EP92/O1827). Se obtuvo el plásmido pRIT14607. El plásmido pRIT14607 recombinante que codifica la proteína de fusión **Clyta-Mage-3-His** se usó para transformar AR 120 de *E. coli* (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci, 82: 88). Una cepa candidata resistente a ampicilina se seleccionó y caracterizó.

35 **3. Preparación del plásmido pRIT 14646:**

Finalmente se construyó un plásmido similar a pRIT 14607 pero que tenía la selección de kanamicina (pRIT 14646)

Caracterización de la proteína recombinante:

40 Se desarrollaron las bacterias sobre un medio LB suplementado con 50 mg/ml de kanamicina a 30°C. Cuando el cultivo había alcanzado una DO = 400 (a 600 nm) se añadió ácido nalidixico hasta una concentración final de 60 μ g/ml.

45 Después de 4 horas de inducción, se recogieron las células, se volvieron a suspender en PBS y se lisaron mediante disgregación (tipo de "un disparo" de CLS de disgregación). Después de la centrifugación, el sobrenadante sedimentado y el extracto total se analizaron mediante SDS - PAGE. Las proteínas se visualizaron en geles teñidos con azul Coomassie, cuando la proteína de fusión representaba aproximadamente el 1% de las proteínas totales de *E. coli*. La proteína de fusión se identificó mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpos policlonales anti-Mage-3 de conejo. La proteína recombinante aparecía como una sola banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 58 kD.

Ejemplo XI:

Purificación de la proteína recombinante CLYTA-Mage-3 His:

50 Las bacterias recombinantes AR120 (pRIT 14646) se desarrollaron en un fermentador de 20 litros en condiciones de alimentación por lote a 30°C. La expresión de la proteína recombinante se indujo añadiendo ácido nalidixico a una concentración final de 60 μ g/ml. Las células se recogieron al final de la fermentación y se lisaron a 60 DO/600 mediante dos pases a través de un disgregador de prensa francesa (20.000 psi (137895 kPa)). Las células lisadas se centrifugaron 20 minutos a 15000 g a 4°C. El sobrenadante que contiene la proteína recombinante se cargó en resina de intercambio de DEAE Sepharose CL6B (Pharmacia) preequilibrada en NaCl 0,3 M, Tris HCl 20 mM pH 7,6 tampón A. Después de un lavado de columna con tampón A, la proteína de fusión se eluyó mediante 2% de colina en (Tampón A). Se reunieron las fracciones de antígeno positivas como reveló el análisis de transferencia de

Western usando un anticuerpo anti Mage-3. El antígeno eluido con DEAE se llevó hasta 0,5% de Empigen BB (un detergente bipolar) y a NaCl 0,5 M antes de cargar en una columna de cromatografía de afinidad de iones metálicos preequilibrada en 0,5% de Empigen BB, NaCl 0,5 M, tampón fosfato 50 mM pH 7,6 (tampón B).

- 5 La columna de IMAC se lavó con tampón B hasta que la absorbancia a 280 nm alcanzó la línea base. Un segundo lavado en tampón B sin Empigen BB (tampón C) con el fin de eliminar el detergente se ejecutó antes de la elución del antígeno mediante un gradiente de imidazol imidazol 0 - 250 mM en tampón C.

Se reunieron las fracciones de imidazol 0,090 - 0,250 M, se concentraron en una membrana Filtron omega de 10 kDa antes de la diálisis frente a tampón PBS.

Conclusión

- 10 Los inventores han demostrado que la proteína de fusión LPD-MAGE3-His es inmunogénica en ratones, y que esta inmunogenicidad (la respuesta proliferativa y respuesta de anticuerpo) se puede incrementar adicionalmente mediante el uso del adyuvante descrito anteriormente. La purificación se puede potenciar derivatizando los tioles que forman enlaces disulfuro.

- 15 Los inventores han demostrado que una mejor respuesta de anticuerpo se desencadenó mediante la vacunación con LPD-MAGE-3-His en presencia del adyuvante. El isotipo predominante encontrado en el suero de C57BL/6 que es IgG2b sugiere que se alcanzó una respuesta inmune de tipo TH1.

En el ser humano, el escenario clínico de un paciente tratado con LPD-MAGE3-His en una formulación no adyuvantada se limpió de melanoma.

REFERENCIAS

- Anichini A., Fossati G., Parmiani G. *Immunol Today*, 8: 385 (1987).
- De Plaen E., Arden K., Traversari C, et al. *Immunogenetics*, 40: 360 (1994).
- Gaugler B., Van den Eynde B., van der Bruggen P., et al. *J. Exp. Med.*, 179: 921 (1994).
- 5 - Herman J., van der Bruggen P., Immanuel F., et al. *Immunogenetics*, 43: 377 (1996).
- Inoue H., Morí M., Li J., et al. *Int. J. Cancer*, 63: 523 (1995).
- Kensii C.R., Soltysik S., Patel U., et al. in: Channock R.M. , Ginsburg H.S., Brown F., et al., (eds.), *Vaccines 92*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), 36-40: (1992).
- Knuth A., Danowski B., Oettgen H.F., et al. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 81:3511 (1984).
- 10 - Patard J.J., Brasseur F., Gil-Diez S., et al. *Int. J. Cáncer*, 64: 60 (1995).
- Ribí E., et al. in: Levine L., Bonventre P.F., Morello J., et al. (eds)., *American Society for Microbiology*, Washington DC, *Microbiology 1986*, 9-13; (1986).
- Van den Eynde B., Hainaut P., Hérin M. et al. *Int. J. Cancer*, 44: 634 (1989).
- Van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., et al. *Science*, 254: 1643 (1991).
- 15 - Van der Bruggen P., Bastin J., Gajewski T., et al. *Eur. J. Immunol.*, 24: 3038 (1994).
- Van Pel A., van der Bruggen P., Coulie P.G. , et al., *Immunol. Rev.*, 145: 229 (1995).
- Weynants P., Lethé B., Brasseur F., et al. *Int. J. Cancer*, 56: 826 (1994).
- 20 - Nishimura S, Fujita M, Terata N, Tani T, Kodama M, Itoh K, *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 1997. Apr. 20 (2): 95-101.
- Fujie T et al, *Ann Oncol* 1997 Apr, 8 (4): 369-72.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- (i) SOLICITANTE: SmithKline Beecham Biologicals
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Vacuna
- 5 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 10
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: SmithKline Beecham
- (B) CALLE: 2 New Horizons Court, Great West Road, B
- (C) CIUDAD: Middx
- 10 (D) ESTADO:
- (E) PAÍS: Reino Unido
- (F) CÓDIGO: TW8 9EP
- (v) FORMA LEGIBLE DE ORDENADOR
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- 15 (B) ORDENADOR: IBM Compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: DOS
- (D) SOFTWARE: FastSEQ para Windows versión 2.0
- (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- 20 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- 25 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO / AGENTE:
- (A) NOMBRE: Dalton, Marcus J
- (B) NÚMERO DE REGISTRO:
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA / EXPEDIENTE: 245126
- 30 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: 0181 9756348
- (B) TELEFAX: 0181 9756177
- (C) TELEX:
- 35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 452 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: individual

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

5

```

Met Asp Pro Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu
 1          5          10          15
Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
 20          25          30
Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
    
```

		35					40					45					
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp		
	50					55					60						
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val		
65					70					75					80		
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe		
				85					90					95			
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr		
			100					105					110				
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Met		
		115					120					125					
Asp	Leu	Glu	Gln	Arg	Ser	Gln	His	Cys	Lys	Pro	Glu	Glu	Gly	Leu	Glu		
	130					135					140						
Ala	Arg	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Gln	Ala	Pro	Ala	Thr		
145					150					155					160		
Glu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Thr		
				165					170					175			
Leu	Gly	Glu	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	Ser	Pro	Asp	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro		
			180					185					190				
Gln	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Thr	Met	Asn	Tyr	Pro	Leu	Trp	Ser		
		195					200					205					
Gln	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Glu	Glu	Glu	Gly	Pro	Ser	Thr		
	210					215					220						
Phe	Pro	Asp	Leu	Glu	Ser	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Arg	Lys	Val		
225					230					235					240		
Ala	Glu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Arg	Ala	Arg	Glu	Pro		
				245					250					255			
Val	Thr	Lys	Ala	Glu	Met	Leu	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Asn	Trp	Gln	Tyr		
			260				265						270				
Phe	Phe	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	Lys	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Val		
		275					280					285					
Phe	Gly	Ile	Glu	Leu	Met	Glu	Val	Asp	Pro	Ile	Gly	His	Leu	Tyr	Ile		
	290					295					300						
Phe	Ala	Thr	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Gly	Asp	Asn		
305					310					315					320		
Gln	Ile	Met	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile		
				325					330					335			
Ala	Arg	Glu	Gly	Asp	Cys	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Ile	Trp	Glu	Glu	Leu		
			340					345					350				
Ser	Val	Leu	Glu	Val	Phe	Glu	Gly	Arg	Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Gly	Asp		
		355					360					365					
Pro	Lys	Lys	Leu	Leu	Thr	Gln	His	Phe	Val	Gln	Glu	Asn	Tyr	Leu	Glu		
						375					380						
Tyr	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Ser	Asp	Pro	Ala	Cys	Tyr	Glu	Phe	Leu	Trp		
385					390					395					400		
Gly	Pro	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Ser	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	His	His		
				405					410					415			
Met	Val	Lys	Ile	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ile	Ser	Tyr	Pro	Pro	Leu	His		
			420					425					430				
Glu	Trp	Val	Leu	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Thr	Ser	Gly	Gly	His	His	His		
		435					440					445					
His	His	His															
	450																

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

5

(A) LONGITUD: 1353 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: individual

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA : SEQ ID NO:2:

ATGGATCCAA	AAACTTTAGC	CCTTTCTTTA	TTAGCAGCTG	GCGTACTAGC	AGGTTGTAGC	60
AGCCATTCAT	CAAAATATGGC	GAATACCCAA	ATGAAATCAG	ACAAAATCAT	TATTGCTCAC	120
CGTGGTGCTA	GCGGTTATTT	ACCAGAGCAT	ACGTTAGAAT	CTAAAGCACT	TGCGTTTGCA	180
CAACAGGCTG	ATTATTTAGA	GCAAGATTTA	GCAATGACTA	AGGATGGTCG	TTTAGTGGTT	240
ATTCACGATC	ACTTTTTAGA	TGGCTTGACT	GATGTTGCGA	AAAAATCCC	ACATCGTCAT	300
CGTAAAGATG	GCCGTTACTA	TGTCATCGAC	TTTACCTTAA	AAGAAATTC	AAGTTTAGAA	360
ATGACAGAAA	ACTTTGAAAC	CATGGATCTG	GAACAGCGTA	GTCAGCACTG	CAAGCCTGAA	420
GAAGGCCTTG	AGGCCGAGG	AGAGGCCCTG	GGCCTGGTGG	GTGCSAGGC	TCCTGCTACT	480
GAGGAGCAGG	AGGCTGCCTC	CTCCTCTTCT	ACTCTAGTTG	AAGTCACCCT	GGGGGAGGTG	540
CCTGCTGCCG	AGTCACCAGA	TCCCTCCAG	AGTCTCAGG	GAGCCTCCAG	CCTCCCCACT	600
ACCATGAACT	ACCCCTCTCTG	GAGCCAATCC	TATGAGGACT	CCAGCAACCA	AGAAGAGGAG	660
GGGCCAAGCA	CCTTCCCTGA	CCTGGAGTCC	GAGTTCCAAG	CAGCACTCAG	TAGGAAGGTG	720
GCCGAATTGG	TTCATTTTCT	GCTCCTCAAG	TATCGAGCCA	GGGAGCCGGT	CACAAAGGCA	780
GAAATGCTGG	GGAGTGTCTG	CGGAAATTGG	CAGTATTTCT	TTCCTGTGAT	CTTCAGCAA	840
GCTCCAGTT	CCTTGCACTG	GGTCTTTGGC	ATCGAGCTGA	TGGAAGTGG	CCCCATCGGC	900
CACTTGATACA	TCTTTGCCAC	CTGCCTGGGC	CTCTCCTACG	ATGGCCTGCT	GGGTGACAA	960
CAGATCATGC	CCAAGGCAGG	CCTCCTGATA	ATCGTCTGG	CCATAATCGC	AAGAGAGGGC	1020
GACTGTGCC	CTGAGGAGAA	AATCTGGGAG	GAGCTGAGTG	TGTTAGAGGT	GTTTGAGGGG	1080
AGGGAAGACA	GTATCTTGGG	GGATCCCAAG	AAGCTGCTCA	CCCAACATTT	CGTGCAGGAA	1140
AACTACCTGG	AGTACCGGCA	GGTCCCCGGC	AGTGATCCTG	CATGTTATGA	ATTCTGTGG	1200
GGTCCAAGGG	CCCTCGTTGA	AACCAGCTAT	GTGAAAGTCC	TGCACCATAT	GGTAAAGATC	1260
AGTGGAGGAC	CTCACATTT	CTACCCACCC	CTGCATGAGT	GGGTTTGTAG	AGAGGGGGAA	1320
GAGGGCGGTC	ATCACCATCA	CCATCACCAT	TAA			1353

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 1341 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: individual

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 3:

```

ATGGATCCAA  AACTTTAGC  CCTTCTTTA  TTAGCAGCTG  GCGTACTAGC  AGGTTGTAGC      60
AGCCATTGAT  CAAATATGGC  GAATACCCAA  ATGAAATCAG  ACAAATCAT  TATTGCTCAC     120
CGTGGTGCTA  GCGGTTATTT  ACCAGAGCAT  ACGTTAGAAT  CTAAAGCACT  TGCCTTTGCA     180
CAACAGGCTG  ATTATTTAGA  GCAAGATTTA  GCAATGACTA  AGGATGGTCG  TTTAGTGGTT     240
ATTCACGATC  ACTTTTLAGA  TGGCTTGACT  GATGTTGCGA  AAAAAATCCC  ACATCGTCAT     300
CGTAAAGATG  GCCGTTACTA  TGTCATCGAC  TTTACCTTAA  AAGAAATCA  AAGTTTAGAA     360
ATGACAGAAA  ACTTTGAAAC  CATGGGCTCT  CTGGAACAGC  GTAGTCTGCA  CTGCAAGCCT     420
GAGGAAGCCC  TTGAGGCCCA  ACAAGAGGCC  CTGGGCCTGG  TGTGTGTGCA  GGCTGCCACC     480
TCCTCCTCCT  CTCCTCTGGT  CCTGGGCACC  CTGGAGGAGG  TGCCCACTGC  TGGGTCAACA     540
GATCCTCCCC  AGAGTCCTCA  GGGAGCCTCC  GCCTTTCCCA  CTACCATCAA  CTTCACTCGA     600
CAGAGGCAAC  CCAGTGAGGG  TTCCAGCAGC  CGTGAAGAGG  AGGGGCCAAG  CACCTCTTGT     660
ATCCTGGAGT  CCTTGTTCGG  AGCAGTAATC  ACTAAGAAGG  TGGCTGATTT  GGTGTTGTTT     720
CTGCTCCTCA  AATATCGAGC  CAGGGAGCCA  GTCACAAAGG  CAGAAATGCT  GGAGAGTGTC     780
ATCAAAAATT  ACAAGCACTG  TTTTCTGAG  ATCTTCGGCA  AAGCCTCTGA  GTCCTTGCAG     840
CTGGTCTTTG  GCATTGACGT  GAAGGAAGCA  GACCCACCG  GCCACTCCTA  TGCCTTGTC     900
ACCTGCCTAG  GTCTCTCCTA  TGATGGCCTG  CTGGGTGATA  ATCAGATCAT  GCCCAAGACA     960
GGCTTCCTGA  TAATTGTCTT  GGTGATGATT  GCAATGGAGG  GCGGCCATGC  TCCTGAGGAG    1020
GAAATCTGGG  AGGAGCTGAG  TGTGATGGAG  GTGTATGATG  GGAGGGAGCA  CAGTGCCTAT    1080
GGGGAGCCCA  GGAAGCTGCT  CACCCAAGAT  TTGGTGCAGG  AAAAGTACCT  GGAGTACCGG    1140
CAGGTGCCGG  ACAGTGATCC  CGCACGCTAT  GAGTTCCTGT  GGGGTCCAAG  GGCCCTCGCT    1200
GAAACCAGCT  ATGTGAAAGT  CCTTGAGTAT  GTGATCAAGG  TCAGTGCAAG  AGTTCGCTTT    1260
TTCTTCCCAT  CCCTGCGTGA  AGCAGCTTGT  AGAGAGGAGG  AAGAGGGAGT  CGGCGGTCAT    1320
CACCATCACC  ATCACCATTA  A
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

- 5 (A) LONGITUD: 466 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: individual
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº 4:

15

Met Asp Pro Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu
 1 5 10 15
 Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
 20 25 30
 Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
 35 40 45
 Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp
 50 55 60
 Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
 65 70 75 80
 Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe
 85 90 95
 Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr
 100 105 110
 Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met
 115 120 125
 Gly Ser Leu Glu Gln Arg Ser Leu His Cys Lys Pro Glu Glu Ala Leu
 130 135 140
 Glu Ala Gln Gln Glu Ala Leu Gly Leu Val Cys Val Gln Ala Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ser Ser Ser Pro Leu Val Leu Gly Thr Leu Glu Glu Val Pro Thr
 165 170 175
 Ala Gly Ser Thr Asp Pro Pro Gln Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ala Phe
 180 185 190
 Pro Thr Thr Ile Asn Phe Thr Arg Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gly Ser
 195 200 205
 Ser Ser Arg Glu Glu Glu Gly Pro Ser Thr Ser Cys Ile Leu Glu Ser
 210 215 220
 Leu Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys Lys Val Ala Asp Leu Val Gly Phe
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met
 245 250 255
 Leu Glu Ser Val Ile Lys Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile Phe
 260 265 270
 Gly Lys Ala Ser Glu Ser Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Asp Val Lys
 275 280 285
 Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr Val Leu Val Thr Cys Leu Gly
 290 295 300
 Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Thr
 305 310 315 320
 Gly Phe Leu Ile Ile Val Leu Val Met Ile Ala Met Glu Gly Gly His
 325 330 335
 Ala Pro Glu Glu Glu Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Met Glu Val Tyr
 340 345 350
 Asp Gly Arg Glu His Ser Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr
 355 360 365
 Gln Asp Leu Val Gln Glu Lys Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Asp
 370 375 380
 Ser Asp Pro Ala Arg Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala
 385 390 395 400
 Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val Ser Ala
 405 410 415
 Arg Val Arg Phe Phe Phe Pro Ser Leu Arg Glu Ala Ala Leu Arg Glu
 420 425 430

Glu Glu Glu Gly Val Gly Gly His His His His His His His
 435 440 445

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 404 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: individual

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 5:

Met	Asp	Pro	Asn	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Gln	Val	Asp	Cys	Phe	Leu	Trp
1				5					10					15	
His	Val	Arg	Lys	Arg	Val	Ala	Asp	Gln	Glu	Leu	Gly	Asp	Ala	Pro	Phe
			20					25					30		
Leu	Asp	Arg	Leu	Arg	Arg	Asp	Gln	Lys	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg	Gly	Ser
		35					40					45			
Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Glu	Thr	Ala	Thr	Arg	Ala	Gly	Lys	Gln	Ile
	50					55					60				
Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Met	Thr
65					70					75					80
Met	Asp	Leu	Glu	Gln	Arg	Ser	Gln	His	Cys	Lys	Pro	Glu	Glu	Gly	Leu
				85					90					95	
Glu	Ala	Arg	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Gln	Ala	Pro	Ala
			100				105						110		
Thr	Glu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Val	Glu	Val
	115						120						125		
Thr	Leu	Gly	Glu	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	Ser	Pro	Asp	Pro	Pro	Gln	Ser
	130					135					140				
Pro	Gln	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Thr	Met	Asn	Tyr	Pro	Leu	Trp
145					150					155					160
Ser	Gln	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Glu	Glu	Glu	Gly	Pro	Ser
				165				170						175	
Thr	Phe	Pro	Asp	Leu	Glu	Ser	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Arg	Lys
			180					185						190	
Val	Ala	Glu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Arg	Ala	Arg	Glu
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ala	Glu	Met	Leu	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Asn	Trp	Gln
	210					215					220				
Tyr	Phe	Phe	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	Lys	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu
225					230				235						240
Val	Phe	Gly	Ile	Glu	Leu	Met	Glu	Val	Asp	Pro	Ile	Gly	His	Leu	Tyr
			245						250					255	
Ile	Phe	Ala	Thr	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Gly	Asp
			260					265						270	
Asn	Gln	Ile	Met	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile
		275					280						285		
Ile	Ala	Arg	Glu	Gly	Asp	Cys	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Ile	Trp	Glu	Glu
	290					295					300				
Leu	Ser	Val	Leu	Glu	Val	Phe	Glu	Gly	Arg	Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Gly
305					310					315					320
Asp	Pro	Lys	Lys	Leu	Leu	Thr	Gln	His	Phe	Val	Gln	Glu	Asn	Tyr	Leu
				325					330					335	
Glu	Tyr	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Ser	Asp	Pro	Ala	Cys	Tyr	Glu	Phe	Leu
			340					345						350	
Trp	Gly	Pro	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Ser	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	His
		355					360						365		
His	Met	Val	Lys	Ile	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ile	Ser	Tyr	Pro	Pro	Leu
	370					375						380			
His	Glu	Trp	Val	Leu	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	His	His	His	His

385

390

395

400

His His His

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 1212 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: individual

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº 6:

10

```

ATGGATCCAA  ACACTGTGTC  AAGCTTTCAG  GTAGATTGCT  TTCTTTGGCA  TGTCGGCAAA  60
CGAGTTGCAG  ACCAAGAACT  AGGTGATGCC  CCATTCCTTG  ATCGGCTTCG  CCGAGATCAG  120
AAATCCCTAA  GAGGAAGGGG  CAGCACTCTT  GGTCTGGACA  TCGAGACAGC  CACACGTGCT  180
GGAAAGCAGA  TAGTGGAGCG  GATTCTGAAA  GAAGAATCCG  ATGAGGCACT  TAAAATGACC  240
ATGGATCTGG  AACAGCGTAG  TCAGCACTGC  AAGCCTGAAG  AAGGCCTTGA  GGCCCGAGGA  300
GAGGCCCTGG  GCCTGGTGGG  TGCGCAGGCT  CCTGCTACTG  AGGAGCAGGA  GGCTGCCTCC  360
TCCTCTTCTA  CTCTAGTTGA  AGTCACCCTG  GGGGAGGTGC  CTGCTGCCGA  GTCACCAGAT  420
CCTCCCCAGA  GTCTCAGGG  AGCCTCCAGC  CTCCCCACTA  CCATGAACTA  CCCTCTCTGG  480
AGCCAATCCT  ATGAGGACTC  CAGCAACCAA  GAAGAGGAGG  GGCCAAGCAC  CTCCCTGAC  540
CTGGAGTCCG  AGTCCAAGC  AGCACTCAGT  AGGAAGGTGG  CCGAATTGGT  TCATTTCTG  600
CTCCTCAAGT  ATCGAGCCAG  GGAGCCGGTC  ACAAAGGCAG  AAATGCTGGG  GAGTGTCGTC  660
GGAAATTGGC  AGTATTTCTT  TCCTGTGATC  TTCAGCAAAG  CTTCCAGTTC  CTTGCAGCTG  720
GTCTTTGGCA  TCGAGCTGAT  GGAAGTGGAC  CCCATCGGCC  ACTTGACAT  CTTTGCCACC  780
TGCCTGGGCC  TCTCTACGA  TGGCCTGCTG  GGTGACAATC  AGATCATGCC  CAAGGCAGGC  840
CTCCTGATAA  TCGTCCTGGC  CATAATCGCA  AGAGAGGGCG  ACTGTGCCCC  TGAGGAGAAA  900
ATCTGGGAGG  AGCTGAGTGT  GTTAGAGGTG  TTTGAGGGGA  GGAAGACAG  TATCTTGGGG  960
GATCCCAAGA  AGTGCTCAC  CCAACATTC  GTGCAGGAAA  ACTACCTGGA  GTACCGGCAG  1020
GTCCCGGCCA  GTGATCCTGC  ATGTTATGAA  TTCCTGTGGG  GTCCAAGGGC  CCTCGTTGAA  1080
ACCAGCTATG  TGAAGTCCCT  GCACCATATG  GTAAGATCA  GTGGAGGACC  TCACATTTCC  1140
TACCCACCC  TGCATGAGTG  GGTTTTGAGA  GAGGGGAAG  AGGGCGGTCA  TCACCATCAC  1200
CATCACCATT  AA  1212
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 7:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 445 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA: individual

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº 7:

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

Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Leu Asp Met Gly
 115 120 125
 Ser Leu Glu Gln Arg Ser Leu His Cys Lys Pro Glu Glu Ala Leu Glu
 130 135 140
 Ala Gln Gln Glu Ala Leu Gly Leu Val Cys Val Gln Ala Ala Thr Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ser Pro Leu Val Leu Gly Thr Leu Glu Glu Val Pro Thr Ala
 165 170 175
 Gly Ser Thr Asp Pro Pro Gln Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ala Phe Pro
 180 185 190
 Thr Thr Ile Asn Phe Thr Arg Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gly Ser Ser
 195 200 205
 Ser Arg Glu Glu Glu Gly Pro Ser Thr Ser Cys Ile Leu Glu Ser Leu
 210 215 220
 Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys Lys Val Ala Asp Leu Val Gly Phe Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu
 245 250 255
 Glu Ser Val Ile Lys Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile Phe Gly
 260 265 270
 Lys Ala Ser Glu Ser Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu
 275 280 285
 Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr Val Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu
 290 295 300
 Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Thr Gly
 305 310 315 320
 Phe Leu Ile Ile Val Leu Val Met Ile Ala Met Glu Gly Gly His Ala
 325 330 335
 Pro Glu Glu Glu Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Met Glu Val Tyr Asp
 340 345 350
 Gly Arg Glu His Ser Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln
 355 360 365
 Asp Leu Val Gln Glu Lys Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Asp Ser
 370 375 380
 Asp Pro Ala Arg Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu
 385 390 395 400
 Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val Ser Ala Arg
 405 410 415
 Val Arg Phe Phe Phe Pro Ser Leu Arg Glu Ala Ala Leu Arg Glu Glu
 420 425 430
 Glu Glu Gly Val Gly Gly His His His His His His
 435 440 445

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

5

(A) LONGITUD: 1338 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: individual
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 8:

```

ATGAAAGGGG GAATTGTACA TTCAGACGGC TCTTATCCAA AAGACAAGTT TGAGAAAATC      60
AATGGCACTT GGTACTACTT TGACAGTTCA GGCTATATGC TTGCAGACCG CTGGAGGAAG      120
CACACAGACG GCAACTGGTA CTGGTTCGAC AACTCAGGCG AAATGGCTAC AGGCTGGAAG      180
AAAATCGCTG ATAAGTGGTA CTATTTCAAC GAAGAAGGTG CCATGAAGAC AGGCTGGGTC      240
AAGTACAAGG AACTTGGTA CTA CTACTTAGAC GCTAAAGAAG GCGCCATGGT ATCAAATGCC      300
TTTATCCAGT CAGCGGACGG AACAGGCTGG TACTACCTCA AACCAGACGG AACACTGGCA      360
GACAGGCCAG AATTGGACAT GGGCTCTCTG GAACAGCGTA GTCTGCACTG CAAGCCTGAG      420
GAAGCCCTTG AGGCCCAACA AGAGGCCCTG GGCCTGGTGT GTGTGCAGGC TGCCACCTCC      480
TCCTCCTCTC CTCTGGTCCT GGGCACCCCTG GAGGAGGTGC CCACTGCTGG GTCAACAGAT      540

```

```

CCTCCCCAGA GTCCTCAGGG AGCCTCCGCC TTTCCCCTA CCATCAACTT CACTCGACAG      600
AGGCAACCCA GTGAGGGTTC CAGCAGCCGT GAAGAGGAGG GGCCAAGCAC CTCTTGATC      660
CTGGAGTCTT TGTTCCGAGC AGTAATCACT AAGAAGGTGG CTGATTTGGT TGGTTTCTG      720
CTCCTCAAT ATCGAGCCAG GGAGCCAGTC ACAAAGGCAG AAATGCTGGA GAGTGTATC      780
AAAAATTACA AGCACTGTTT TCCTGAGATC TTCGGCAAAG CCTCTGAGTC CTGTCAGCTG      840
GTCTTTGGCA TTGACGTGAA GGAAGCAGAC CCCACCGGCC ACTCCTATGT CCTGTGACC      900
TGCCTAGGTC TCTCCTATGA TGGCTGCTG GGTGATAATC AGATCATGCC CAAGACAGGC      960
TTCTGATAA TTGTCCTGGT CATGATTGCA ATGGAGGGCG GCCATGCTCC TGAGGAGGAA     1020
ATCTGGGAGG AGCTGAGTGT GATGGAGGTG TATGATGGGA GGGAGCACAG TGCCATGGG     1080
GAGCCCAGGA AGCTGCTCAC CCAAGATTTG GTGCAGGAAA AGTACCTGGA GTACCGGCAG     1140
GTCCCGGACA GTGATCCCGC ACGCTATGAG TTCCTGTGGG GTCCAAGGGC CCTCGCTGAA     1200
ACCAGCTATG TGAAAGTCTT TGAGTATGTG ATCAAGGTCA GTGCAAGAGT TCGCTTTTTT     1260
TTCCCATCCC TCGGTGAAGC AGCTTTGAGA GAGGAGGAAG AGGGAGTCGG CGGTCATCAC     1320
CATCACCATC ACCATTAA

```

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 454 aminoácidos

15

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE HEBRA: individual
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 9:

Met Lys Gly Gly Ile Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp
 35 40 45
 Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
 50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
 85 90 95
 Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr
 100 105 110
 Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Leu Ala Ser Met
 115 120 125
 Leu Asp Met Asp Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu
 130 135 140
 Gly Leu Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala
 145 150 155 160
 Pro Ala Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Thr Leu Val
 165 170 175
 Glu Val Thr Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro
 180 185 190
 Gln Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro
 195 200 205
 Leu Trp Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Gly
 210 215 220
 Pro Ser Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser
 225 230 235 240
 Arg Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala
 245 250 255
 Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn
 260 265 270
 Trp Gln Tyr Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu
 275 280 285
 Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His

290 295 300
 Leu Tyr Ile Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu
 305 310 315 320
 Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu
 325 330 335
 Ala Ile Ile Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp
 340 345 350
 Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile
 355 360 365
 Leu Gly Asp Pro Lys Lys Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn
 370 375 380
 Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu
 385 390 395 400
 Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val
 405 410 415
 Leu His His Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro
 420 425 430
 Pro Leu His Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu Gly Gly His His
 435 440 445
 His His His His
 450

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA

(A) LONGITUD: 1362 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: individual

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº 10:

ATGAAAGGGG	GAATTGTACA	TTCAGACGGC	TCTTATCCAA	AAGACAAGTT	TGAGAAAATC	60
AATGGCACTT	GGTACTACTT	TGACAGTTCA	GGCTATATGC	TTGCAGACCG	CTGGAGGAAG	120
CACACAGACG	GCAACTGGTA	CTGGTTCGAC	AACTCAGGCG	AAATGGCTAC	AGGCTGGAAG	180
AAAATCGCTG	ATAAGTGGTA	CTATTTCAAC	GAAGAAGGTG	CCATGAAGAC	AGGCTGGGTC	240
AAGTACAAGG	ACACTTGGTA	CTACTTAGAC	GCTAAAGAAG	GCGCCATGGT	ATCAAATGCC	300
TTTATCCAGT	CAGCGACGG	AACAGGCTGG	TACTACCTCA	AACCAGACGG	AACACTGGCA	360
GACAGGCCAG	AATTGGCCAG	CATGCTGGAC	ATGGATCTGG	AACAGCGTAG	TCAGCACTGC	420
AAGCCTGAAG	AAGGCCTTGA	GGCCCGAGGA	GAGGCCCTGG	GCCTGGTGGG	TGCGCAGGCT	480
CCTGCTACTG	AGGAGCAGGA	GGCTGCCTCC	TCCTCTTCTA	CTCTAGTTGA	AGTCACCCTG	540
GGGGAGGTGC	CTGCTGCCGA	GTCACCAGAT	CCTCCCCAGA	GTCCCTCAGG	AGCCTCCAGC	600
CTCCCCACTA	CCATGAACTA	CCCTCTCTGG	AGCCAATCCT	ATGAGGACTC	CAGCAACCAA	660
GAAGAGGAGG	GGCCAAGCAC	CTTCCCTGAC	CTGGAGTCTG	AGTTCCAAGC	AGCACTCAGT	720
AGGAAGGTGG	CCAAGTTGGT	TCATTTTCTG	CTCCTCAAGT	ATCGAGCCAG	GGAGCCGGTC	780
ACAAAGGCAG	AAATGCTGGG	GAGTGTCTGC	GGAAATTGGC	AGTACTTCTT	TCCTGTGATC	840
TTCAGCAAAG	CTTCCGATTC	CTTGCAGCTG	GTCTTTGGCA	TCGAGCTGAT	GGAGTGGAC	900
CCCATCGGCC	ACGTGTACAT	CTTTGCCACC	TGCCTGGGCC	TCTCCTACGA	TGGCCTGCTG	960
GGTGACAATC	AGATCATGCC	CAAGACAGGC	TTCCTGATAA	TCATCCTGGC	CATAATCGCA	1020
AAAGAGGGCG	ACTGTGCCCC	TGAGGAGAAA	ATCTGGGAGG	AGCTGAGTGT	GTTAGAGGTG	1080
TTTGAGGGGA	GGGAAGACAG	TATCTTCGGG	GATCCCAAGA	AGCTGCTCAC	CCAATATTTT	1140
GTGCAGGAAA	ACTACCTGGA	GTACCGGCAG	GTCCCCGGCA	GTGATCCTGC	ATGCTATGAG	1200
TTCTGTGGG	GTCCAAGGGC	CCTCATTGAA	ACCAGCTATG	TGAAAGTCCT	GCACCATATG	1260
GTAAGATCA	GTGGAGGACC	TCGCATTTCC	TACCCACTCC	TGCATGAGTG	GGCTTTGAGA	1320
GAGGGGGAAG	AGGGCGGTCA	TCACCATCAC	CATCACCATT	AA		1362

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende un antígeno codificado por la familia de genes MAGE unidos a una pareja de fusión seleccionada de:
- 5 (i) proteína NS1 de Influenza o un fragmento de la misma que comprende los 81 aminoácidos N terminales de la proteína NS1; o
- (ii) LytA de *Streptococcus pneumoniae* o un fragmento de la misma que comprende: (a) la parte C terminal de Lyt-A; (b) la parte de repetición de la molécula de LytA hallada en el extremo C terminal que comienza en el residuo 178; y/o (c) 188 - 305 residuos de aminoácidos de LytA
- (iii) proteína D de *Haemophilus influenzae* B o un fragmento de la misma que comprende
- 10 (a) aproximadamente el primer 1/3 de la proteína D;
- (b) los primeros 109 aminoácidos de la lipoproteína D; o
- (c) los 100 a 110 aminoácidos N terminales de la proteína D.
2. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una marca de afinidad.
3. Una proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteína D es la forma lipidada de la proteína D.
- 15 4. Una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno se codifica por un gen MAGE seleccionado del grupo: MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6, MAGE A7, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12, MAGE B1, MAGE B2, MAGE B3, MAGE B4, MAGE C1 y MAGE C2.
- 20 5. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. Un vector que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula huésped transformada con un vector de la reivindicación 6.
8. Una vacuna que contiene una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un ácido nucleico según la reivindicación 5.
- 25 9. Una vacuna según la reivindicación 8, que comprende adicionalmente un adyuvante, y/o citoquina o quimioquina inmunoestimuladora.
10. Una vacuna según la reivindicación 8 ó 9, en la que la proteína se presenta en un vehículo en emulsión aceite en agua o agua en aceite.
- 30 11. Una vacuna según la reivindicación 9 ó 10 en la que el adyuvante comprende 3D-MPL, QS21 o un oligonucleótido CpG.
12. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende adicionalmente uno o más otros antígenos.
13. Una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para uso en medicina.
- 35 14. Uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o ácido nucleico según la reivindicación 5, para la fabricación de una vacuna para tratar inmunoterapéuticamente un paciente que sufre de melanomas u otros tumores asociados a MAGE, que incluye mama, vejiga, pulmón, NSCLC, cabeza y carcinoma de células escamosas, carcinoma de colon y carcinoma de esófago.

Figura 1: LPD-MAGE-3-His

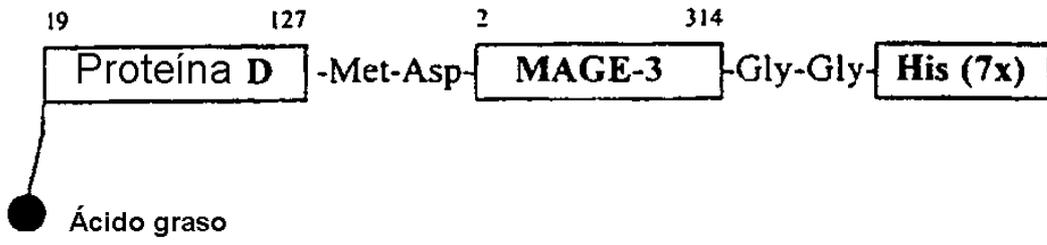


FIGURA 2: Construcción del vector de expresión pRIT 14586

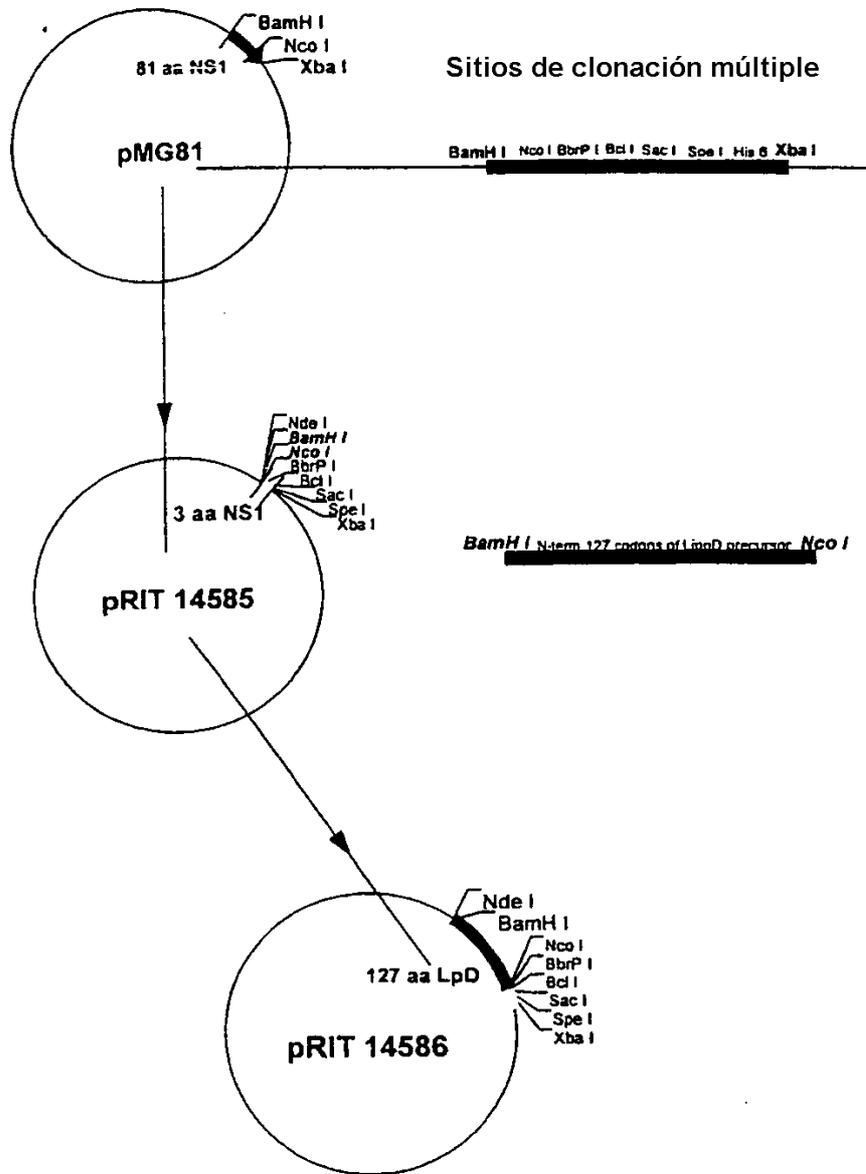


FIGURA 3: Construcción de plásmido pRIT 14477 que expresa la proteína de fusión Prot. D 1/3-MAGE-3-cola His

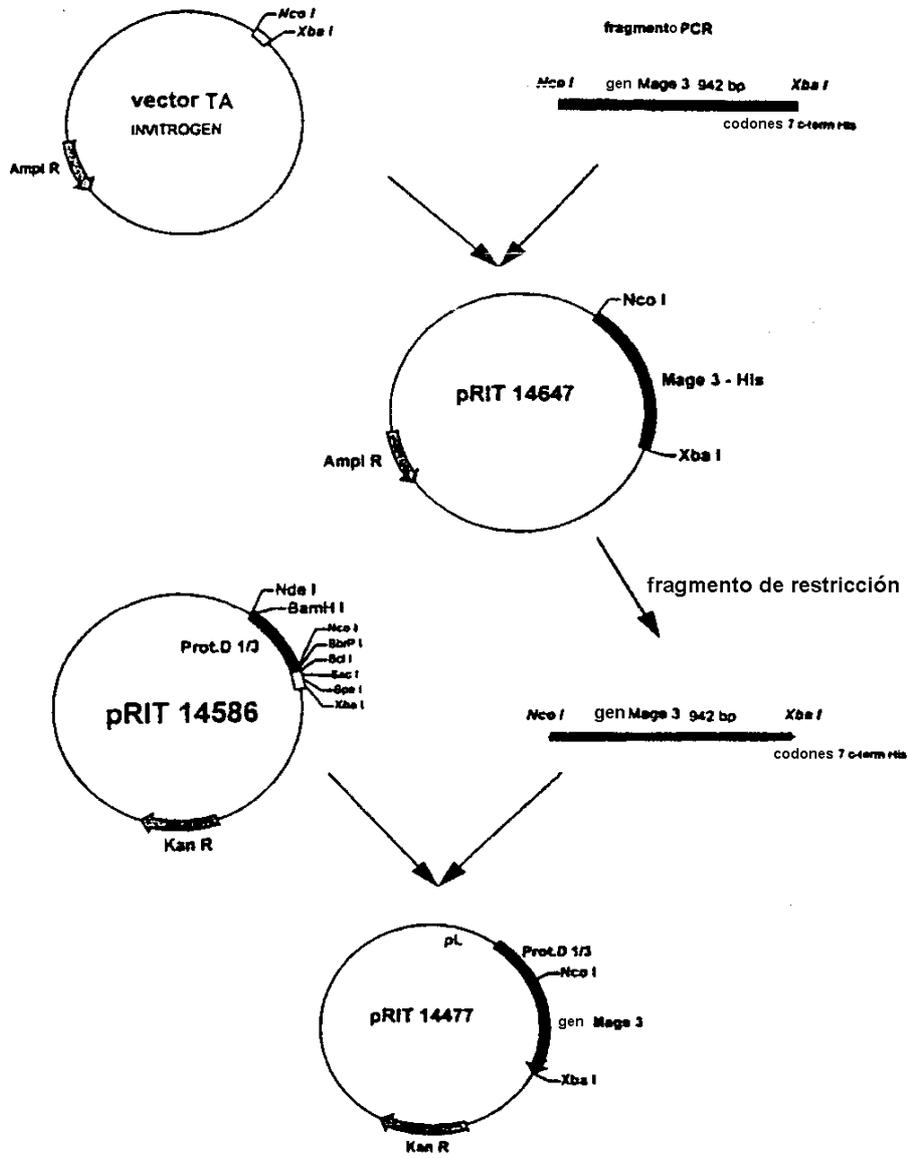
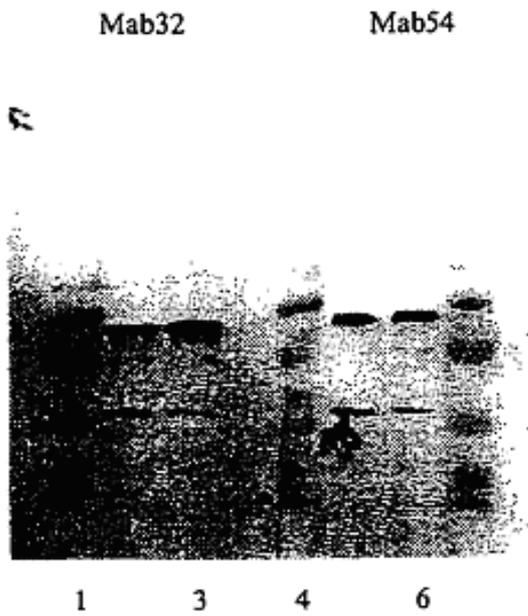


FIGURA 4: Análisis de transferencia de Western de proteína LPD-MAGE-3-His
Anticuerpos monoclonales anti-MAGE-3 Mab 32 y Mab 54



1, 4, y 7 : peso molecular
2 : lote 96K19 revelado con Mab 32
3 : lote 96J22 revelado con Mab 32
4 : lote 96K19 revelado con Mab 54
5 : lote 96J22 revelado con Mab 54

Figura 5

INMUNOGENICIDAD DE MAGE 3 EN RATONES (C57BL6)

Linfoproliferación en células del bazo.

72 horas de estimulación con 0,1 µg/ml de His Mage 3 sobre µperlas

Grupos de ratones	Incorporación de timidina 3H: línea base (CPM): 0,1 µg/ml de µperlas
S1 Lipo D Mage3 His no formulada	1284
S2 LipoD Mage3 His + SBAS2	679
S3 SBAS2	805
S4 medio	1242

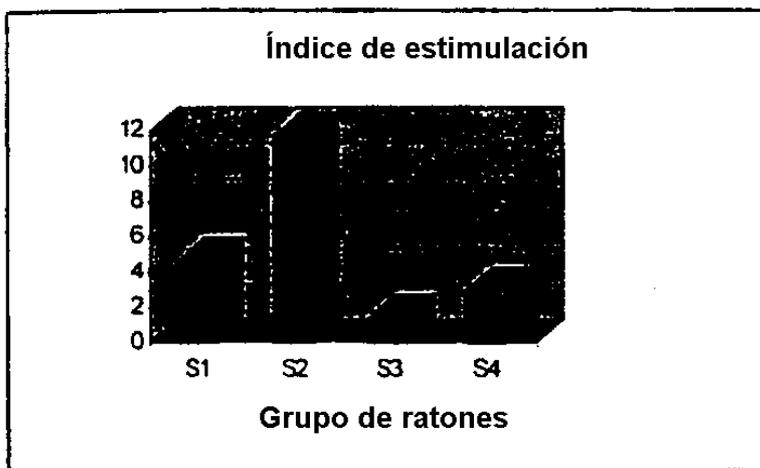


FIGURA 6:

INMUNOGENICIDAD DE MAGE 3 EN RATONES (C57BL6)

Linfoproliferación en células de los nódulos linfáticos.

72 horas de estimulación con 1 µg/ml de His Mage 3 sobre µperlas

Grupos de ratones		Incorporación de timidina 3H: línea base (CPM): 1 µg/ml de µperlas
LN1	Lipo D Mage3 His no formulada	477
LN2	LipoD Mage His + SBAS2	1025
LN3	SBAS2	251
LN4	medio	110

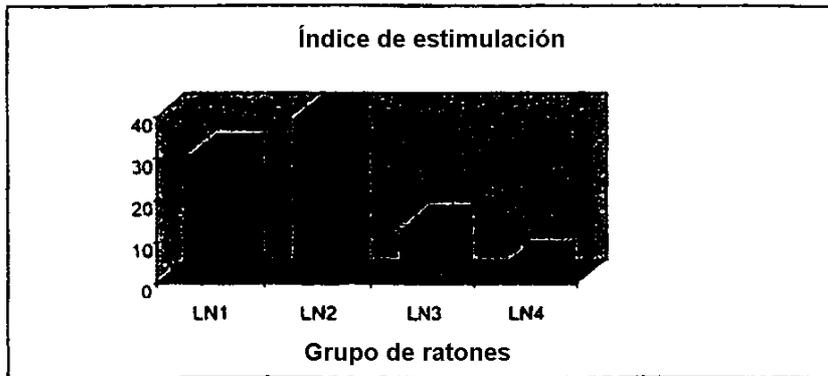


FIGURA 7:

INMUNOGENICIDAD DE MAGE 3 EN RATONES (BalbC)

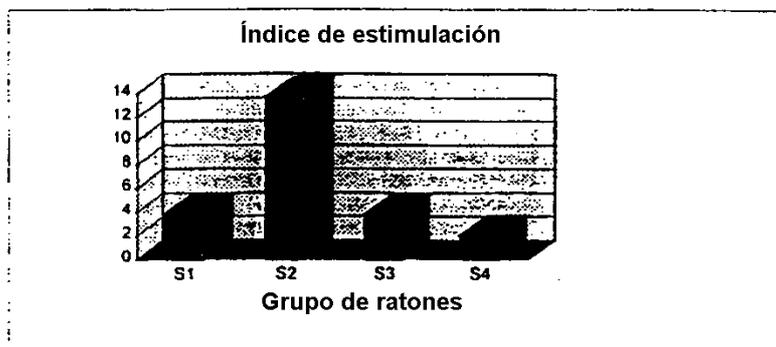
Linfoproliferación en células del bazo.

72 horas de estimulación con 0,1 µg/ml de His Mage 3 (A)

His Mage 3 revestida sobre µperlas (B)

Grupos de ratones		Incorporación de timidina 3H: cpm	
		ninguna	0,1 µg/ml de µperlas
S1	Lipo D Mage3 His no formulada	1002	1329
S2	LipoD Mage3 His + SBAS2	1738	4997
S3	SBAS2	1685	3393
S4	medio	1535	1129

A



B

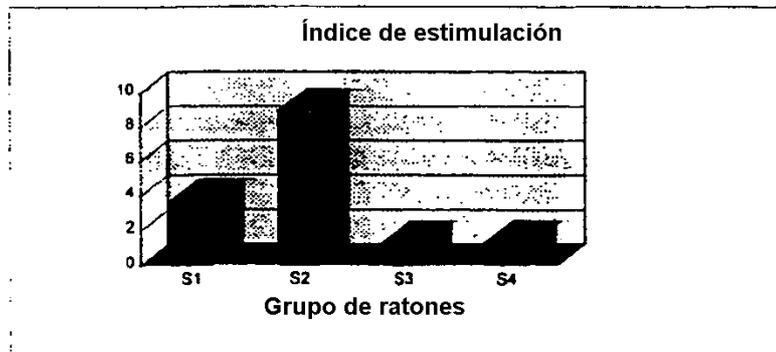


FIGURA 8:

INMUNOGENICIDAD DE MAGE 3 EN RATONES (BalbC)

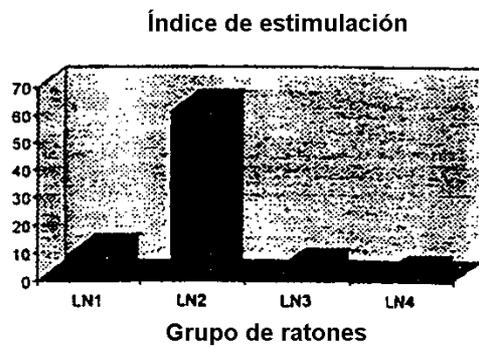
Linfoproliferación en células de los nódulos linfáticos poplíteos.

72 horas de estimulación con 1 µg/ml de His Mage 3 (A)

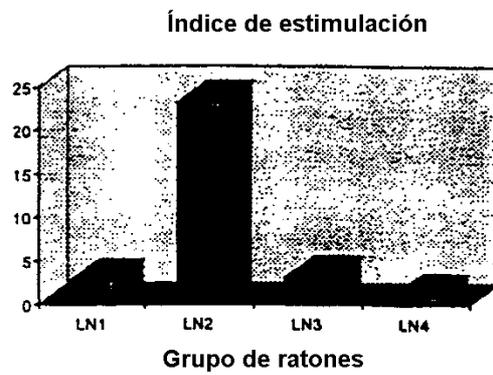
His Mage 3 revestida sobre µperlas (B)

Grupos de ratones		Incorporación de timidina 3H: cpm	
		ninguna	1 µg/ml de µperlas
LN1	Lipo D Mage3 His no formulada	309	386
LN2	LipoD Mage3 His + SBAS2	438	410
LN3	SBAS2	522	637
LN4	medio	318	399

A

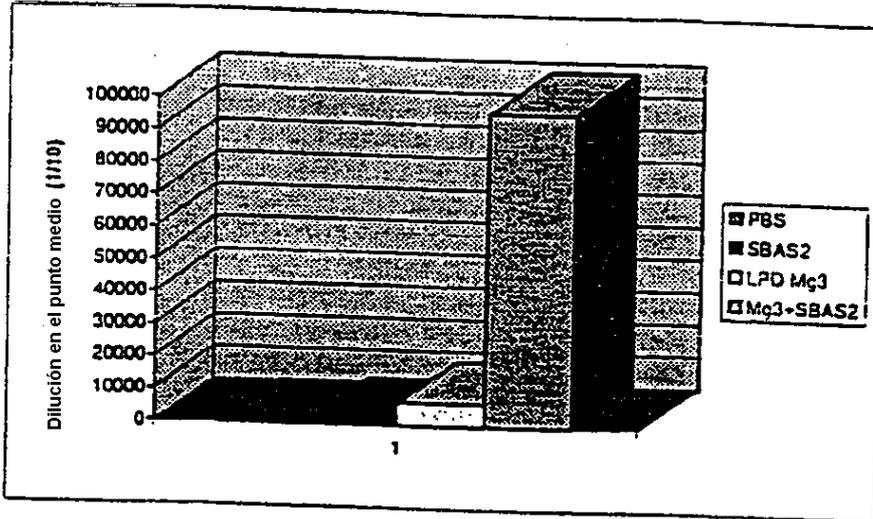


B

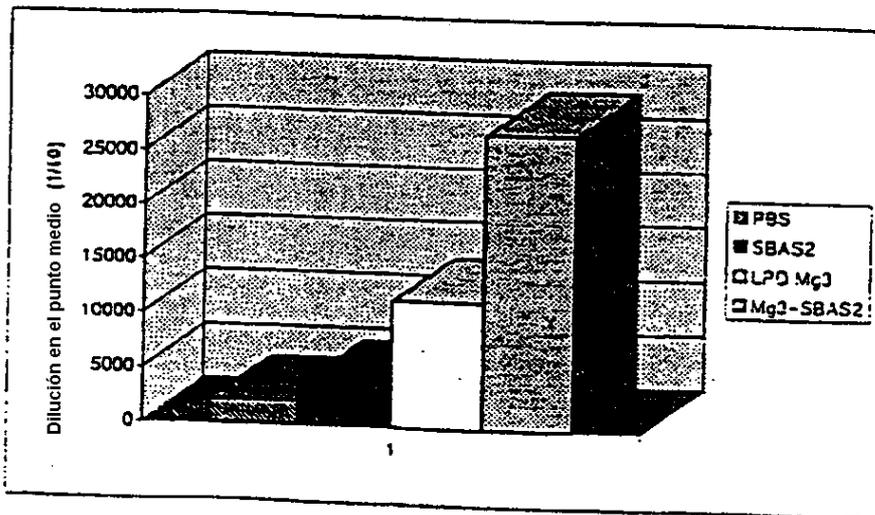


Anticuerpos anti-Mage3 en el suero de ratones inmunizados con LipoD Mage3 His en SBAS2 o no

Ratones BALB C

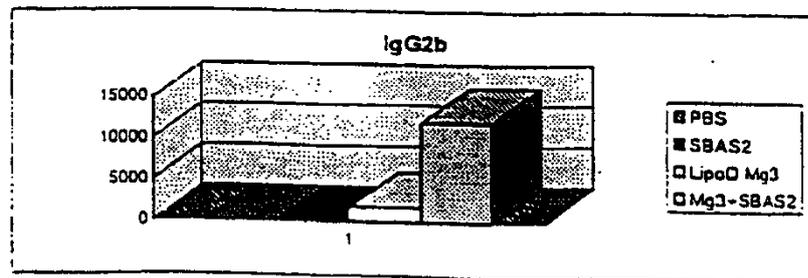
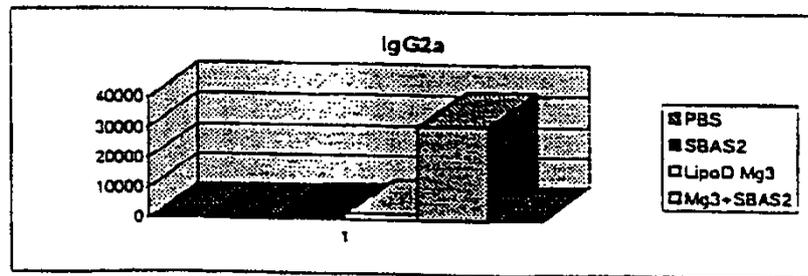
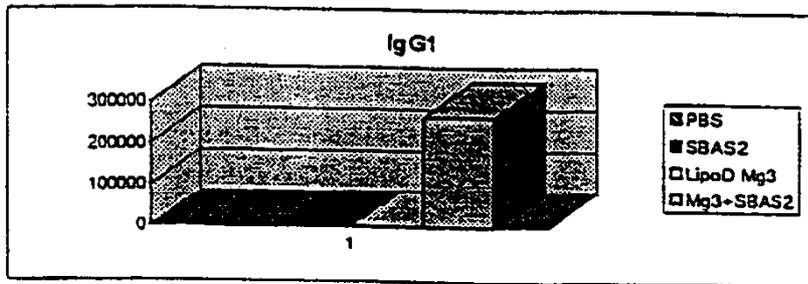
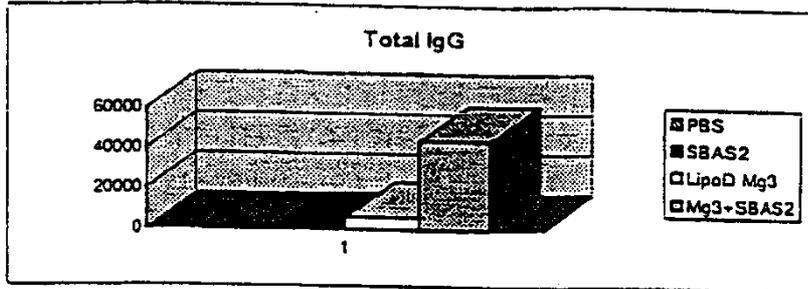


Ratones C57BL/6



Respuestas de anticuerpos especificos de subclase en ratones BalbC

	Tot. IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgA	IgM
PBS	0	0	0	0	0	0
SBAS2	733	719	378	11	0	0
LPD Mg3 His	6182	2049	2058	1835	0	0
LPD Mg3 H /SBAS2	44321	267884	31325	12160	0	0



Respuestas de anticuerpos específicos de subclase en ratones C57BL/6

	Total IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgA	IgM
PBS	807	405	718	22,8	2,8	33,8
SBAS2	37	137	0	0	0	19
LPD Mg3His	5471	1343	332	4540	135	5
LPD Mg3H/SBAS2	11489	2477	2070	8118	55	46

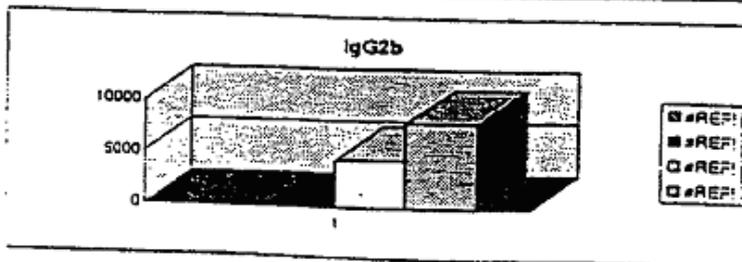
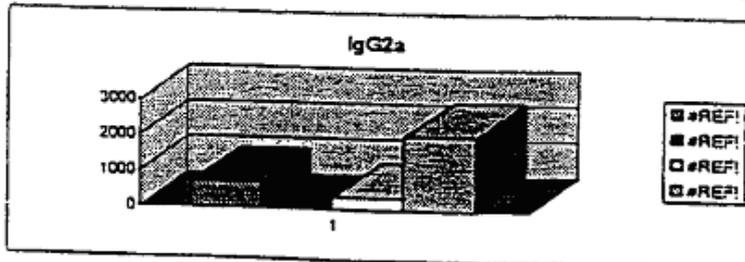
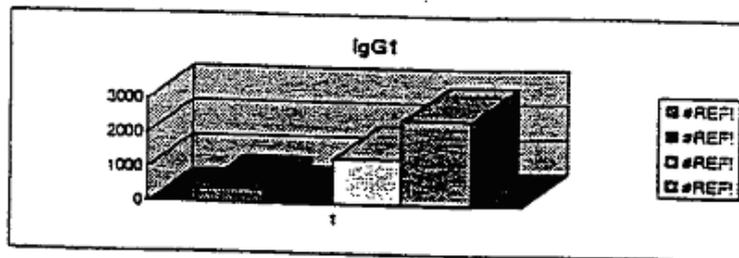
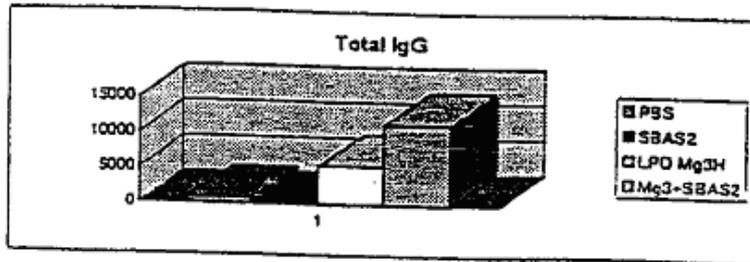


Figura 12

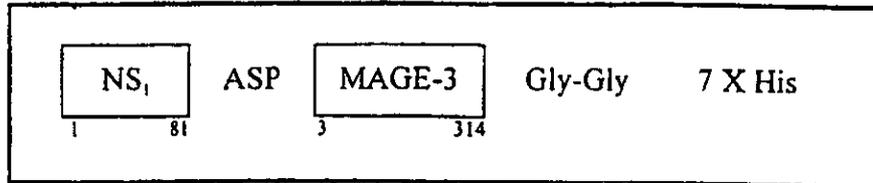


Figura 13 Construcción de plásmido pRIT14426

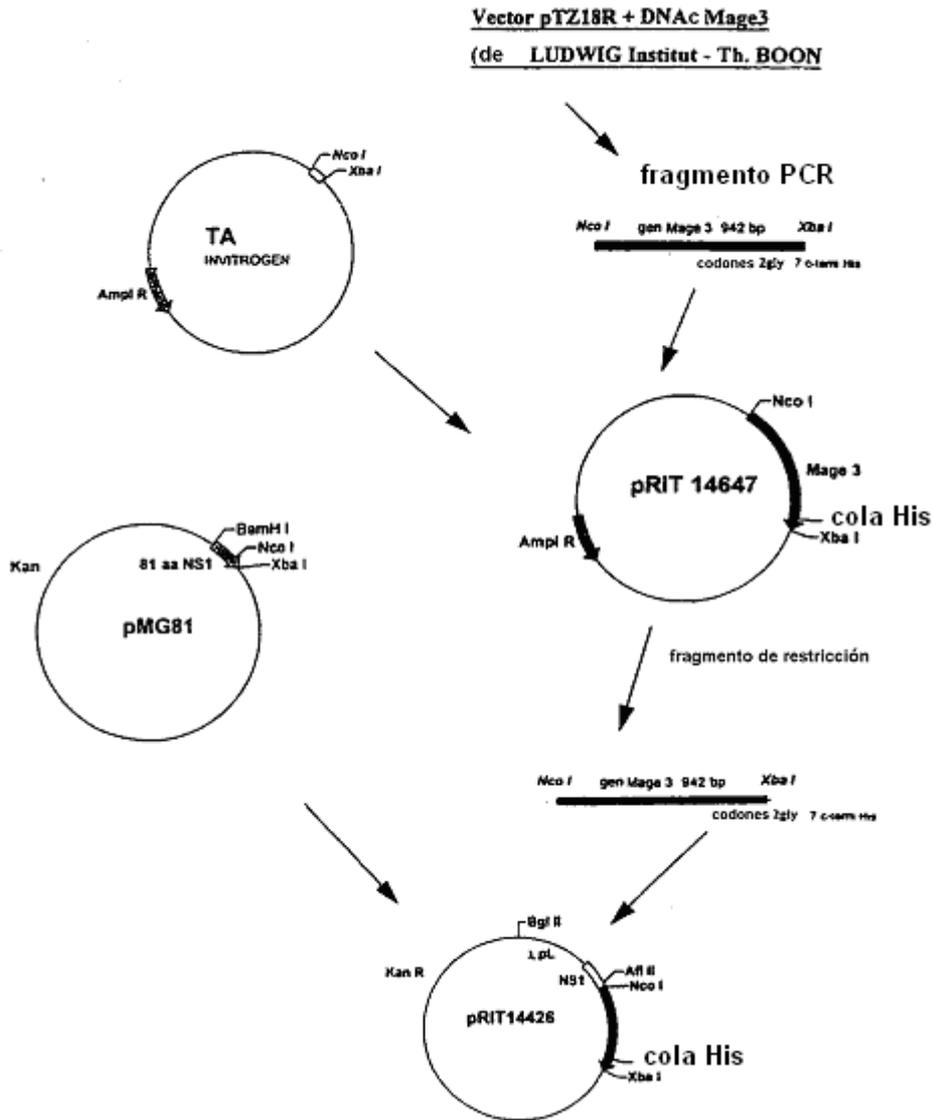
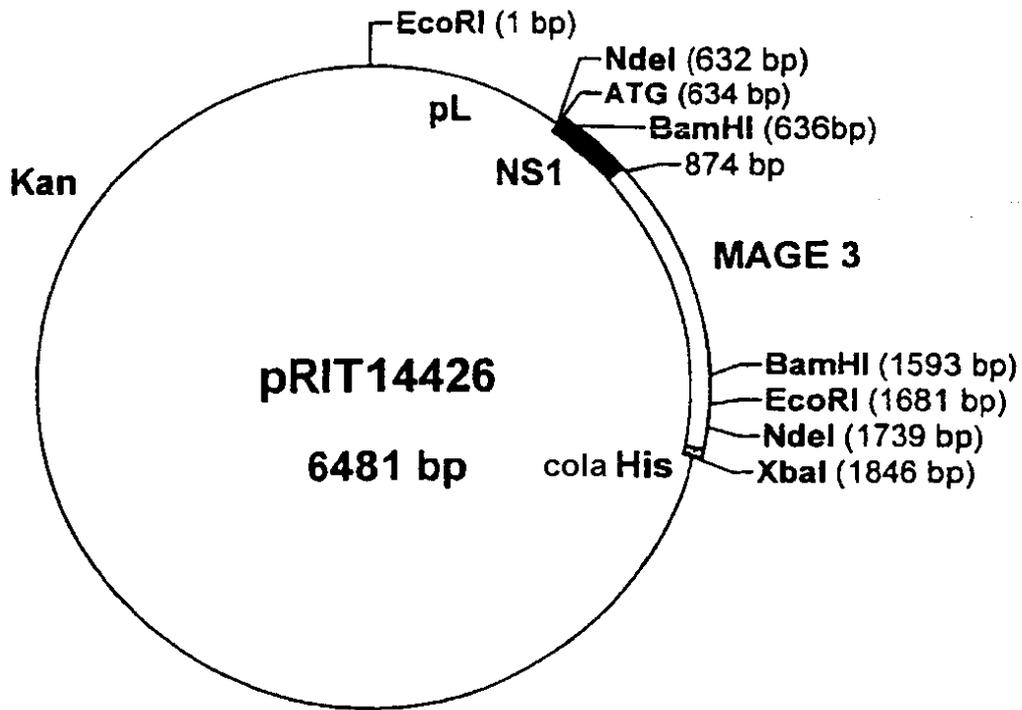


Figura 14: Mapa de plásmido de pRIT14426



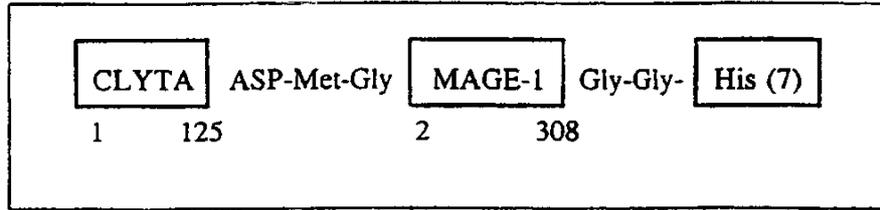


Figura 16: construcción de plásmido pRIT 14613.

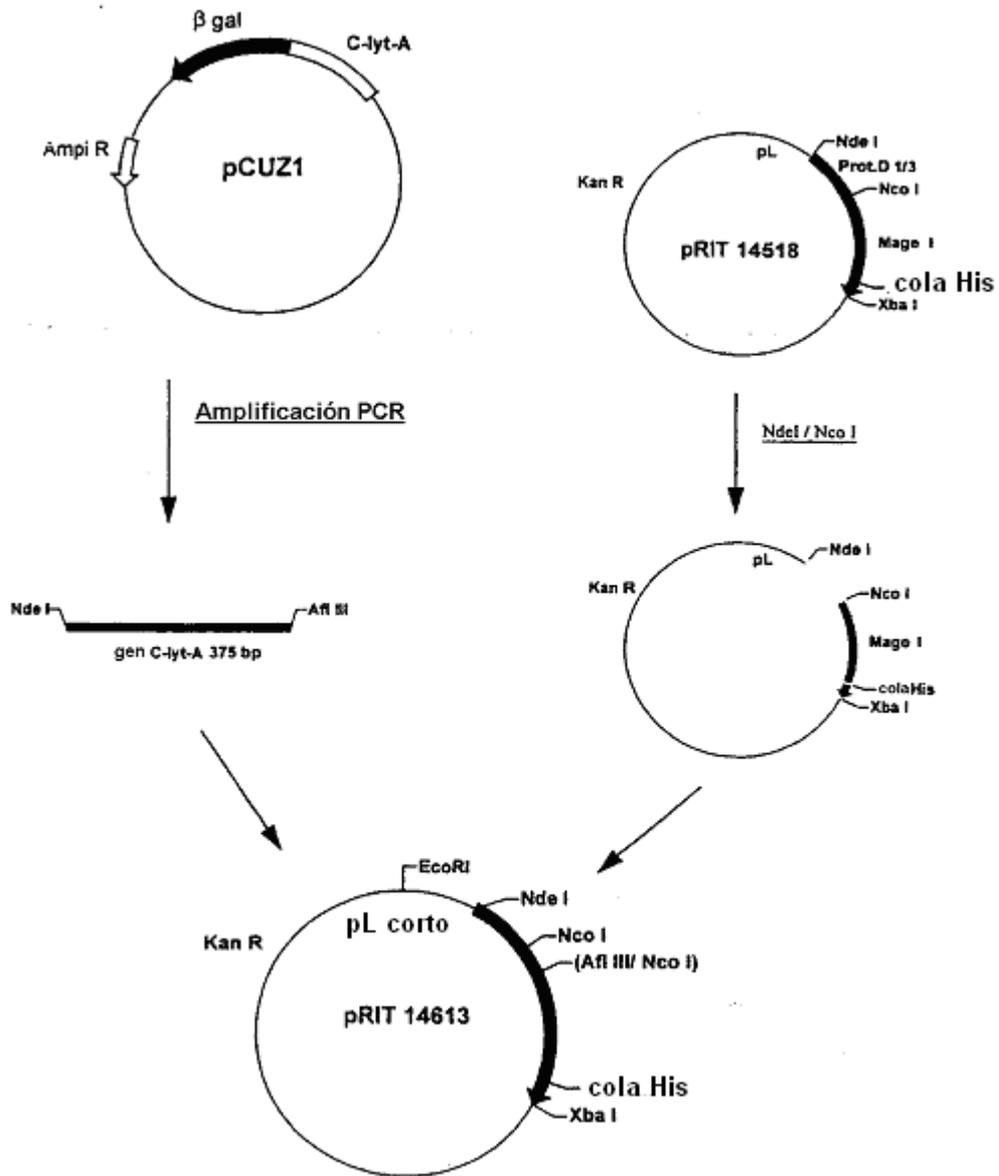


Figura 17 construcción de pRIT 14614

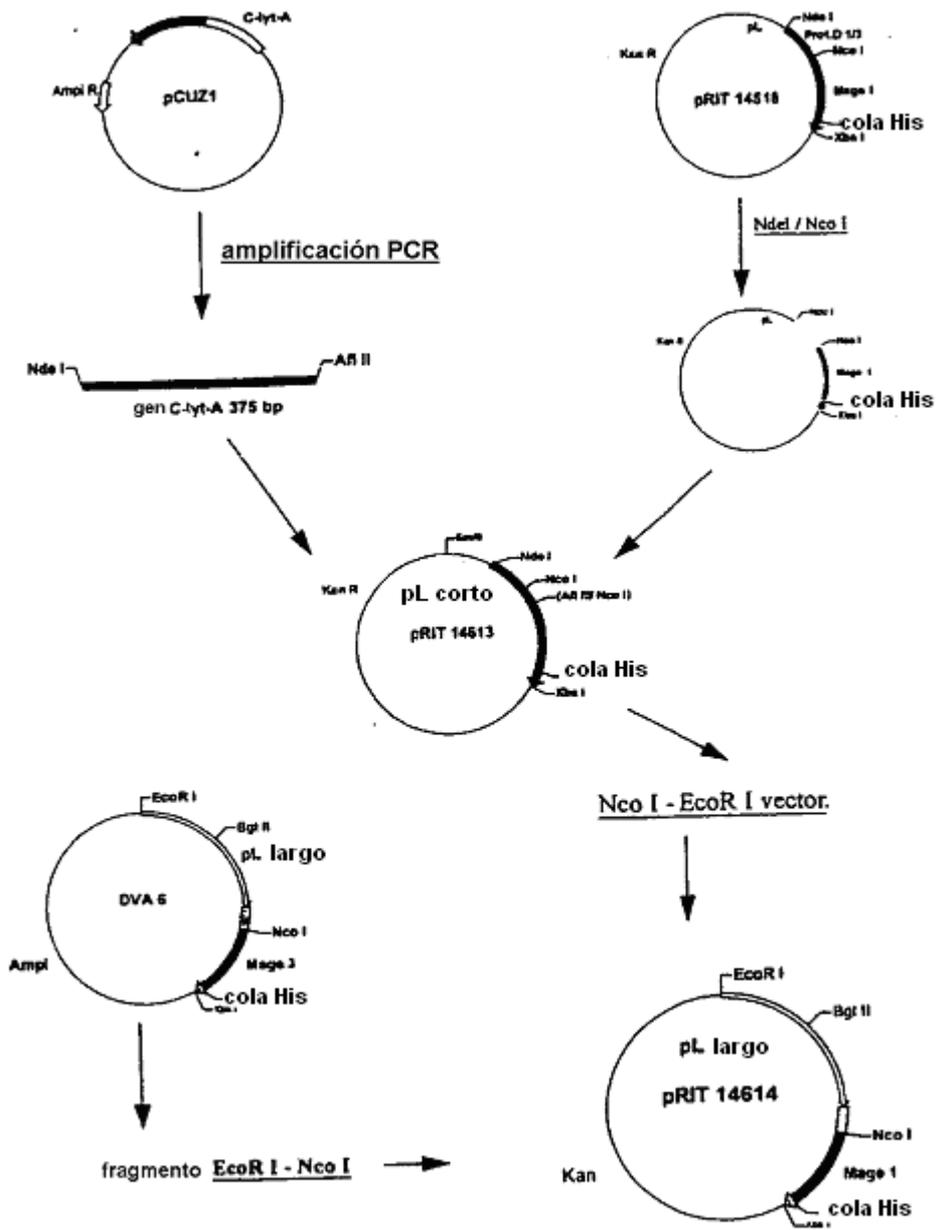


Figura 18

CLYTA Ala-Ser-Met-Leu-Asp MAGE-3 Gly-Gly- HIS (7)

Figura 19

Figura 19: construcción del plásmido pRIT 14646

