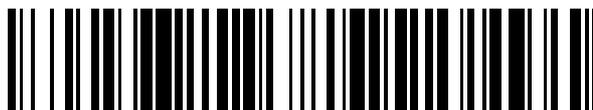


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 040**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06792355 .7**
96 Fecha de presentación: **03.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1934246**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2008**

54 Título: **VACUNA DE METALOPROTEINASA 11 DE LA MATRIZ.**

30 Prioridad:
07.10.2005 US 724498 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.12.2011

73 Titular/es:
**Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare P.
Angeletti S.R.L.
Via Vitorchiano 151
00189 Roma, IT**

72 Inventor/es:
**AURISICCHIO, Luigi;
LA MONICA, Nicola;
CILIBERTO, Gennaro;
LAZZARO, Domenico;
MORI, Federica y
PERUZZI, Daniela**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 370 040 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

Vacuna de metaloproteínasa 11 de la matriz

Antecedentes de la invención**(1) Campo de la Invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden metaloproteínasa 11 de la matriz (MMP-11) o estromelina-3 (ST-3) o el ácido nucleico que codifica la MMP-11 para su uso en vacunas para tratar tumores y cánceres, que sobreexpresan MMP-11. En realizaciones particulares, las composiciones comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que incluye una MMP-11 catalíticamente inactivada unida en el extremo C-terminal a un elemento inmunopotenciador, en el que los codones que codifican la MMP-11 y el elemento
10 inmunopotenciador se han optimizado para obtener una expresión potenciada del polipéptido de fusión en células humanas. En otras realizaciones, las composiciones comprenden la MMP-11 catalíticamente inactivada unida en el extremo C-terminal a un elemento inmunopotenciador. Las composiciones se pueden usar solas o en sinergia con vacunas contra otros antígenos asociados a tumores así como con terapias convencionales tales como terapia de radiación y quimioterapia.

(2) Descripción de la técnica relacionada

La metaloproteínasa-11 de la matriz (MMP-11) o estromelina 3 (ST3) se expresa en muchos (si no en la mayoría) carcinomas primarios invasivos y en una serie de sus metástasis y menos frecuentemente en sarcomas y otras neoplasias malignas no epiteliales (véase Basset y cols., *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 26: 43-53, (1997)). La medición de los niveles de expresión de la MMP-11 puede usarse para identificar los pacientes con mayor riesgo de recurrencia del cáncer. Se ha demostrado que los carcinomas de mama recurrentes aparecieron con más frecuencia en pacientes que tenían niveles elevados de ARN de MMP-11 o proteína o en sus tumores que en pacientes que tenían niveles bajos de ARN de MMP-11 o proteína en sus tumores. De forma similar, se observó que la expresión de la MMP-11 estaba aumentada en tumores pancreáticos en comparación con tejido normal y el nivel de expresión de la MMP-11 estaba fuertemente asociado con la implicación de los nódulos linfáticos y la supervivencia global (Jones y cols., *Clin. Cancer Res.* 10: 2832-2845, (2004)). La expresión de ARNm de MMP-11 también está aumentada significativamente en carcinomas de colon comparada con la expresión de ARNm de MMP-11 en tejido no tumoral (Thewes y cols., *Diagn. Mol. Pathol.* 5: 284-290, (1996)).

El papel de la MMP-11 en la progresión del cáncer ha sido demostrado por varias observaciones preclínicas. Por ejemplo, se demostró que la expresión de la MMP-11 promueve la aparición de tumores en ratones (Noel y cols., *J Clin Invest* 97: 1924-1930 (1996)). también se demostró que la MMP-11 promueve la migración de células epiteliales malignas de una forma paracrina y la migración parece requerir factores extracelulares asociados a la matriz (Masson y cols., *J. Cell Biol.* 140: 1535-1541 (1998)) tales como factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Mari y cols., *J. Biol. Chem.* 273: 618-626 (1998)). La actividad proteasa de la MMP-11 puede modular la progresión del cáncer remodelando la matriz extracelular e induciéndola a liberar factores microambientales (Noel y cols., *Oncogene* 19: 1605-1612 (2000)). La MMP-11 ha demostrado tener un efecto antiapoptótico y antinecrótico sobre células tumorales (Boulay y cols., *Cancer Res.* 61: 2189-2193 (2001)), que parece estar mediado por su actividad catalítica (Wu y cols., *J. Cell Biochem.* 82:549-555 (2001)). Se ha demostrado que la deficiencia de MMP-11 aumenta la supervivencia libre del tumor y modula la invasión local o distante (Andarawewa y cols., *Cancer Res.* 63:5844-5849 (2003)). Parece que la inactivación del ARNm de MMP-11 en células de cáncer gástrico suprime espectacularmente el crecimiento del tumor tanto in vitro como in vivo (Deng y cols., *Biochem. Biophys. Res Comm.* 26: 274-281 (2005)). También se ha demostrado que la MMP-11 interfiere con la respuesta del sistema inmunitario frente a tumores en cuanto que un producto de escisión del inhibidor al-proteínasa, generado por escisión de la MMP-11, reduce la sensibilidad de las células tumorales a las células asesinas naturales (NK) (Kataoka y cols., *Am. J. Pathol.* 154: 457-468, (1999)). Además, un número aumentado de neutrófilos y macrófagos infiltra tumores en ratones que no tienen MMP-11 en comparación con ratones de tipo salvaje, indicando que la MMP-11 inhibe un quimioatrayente para estas células (Boulay y cols., *Cancer Res.* 61: 2189-2193 (2001)). Así, la MMP-11 parece desempeñar un papel crucial en la fase inicial de tumorigénesis.

Se han desarrollado varios agentes que bloquean la síntesis de las MMP, evitan que interaccionen con las moléculas que dirigen sus actividades hacia la superficie celular, o inhiben su actividad enzimática (revisados en Egeblad y Werb, *Nature Reviews* 2: 163-174 (2002)). La mayoría de los agentes no estaban dirigidos específicamente contra la MMP-11 pero interferían con las funciones de otros miembros de la familia MMP. No obstante, ensayos clínicos con varios de estos inhibidores de MMP han sugerido que los inhibidores tienen un efecto antitumoral limitado. Por lo tanto, a la luz de lo anterior, existe una necesidad de tratamientos anticáncer y tratamientos que inhiban o interfieran con la actividad de la MMP-11.

55 Fromigué y cols, *Int. J. Cancer*, 106:355-363 (2003), usando materiales de Wu y cols, encontraron que la ST3wt, más que la ST3cat, puede potenciar la supervivencia de las células MCF-7.

Damjanovski y cols., *Developmental Dynamics*, 221:37-47 (2001) y Fu y cols, *J. Biol. Chem.*, 280:27856-27865 (2005) divulgan la ST3 de *Xenopus* que se inactiva catalíticamente mutando el dominio de unión a zinc 204E a A.

El documento WO-A-2004052301 (Isis Pharmaceuticals, Inc.) divulga oligonucleótidos que modulan los niveles de expresión de MMP-11.

El documento WO-A-2005077977 (Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare P. Angeletti S.p.A.) divulga el uso de la secuencia señal LTB truncada para estimular respuestas inmunitarias.

5 **Sumario breve de la invención**

La presente invención proporciona composiciones que comprenden metaloproteinasa 11 de la matriz (MMP-11) o estromelina-3 (ST-3) o el ácido nucleico que codifica la MMP-11 para su uso en vacunas para tratar tumores y cánceres, que sobreexpresan MMP-11. En realizaciones particulares, las composiciones comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que incluye una MMP-11 catalíticamente inactivada unida en el extremo C-terminal a un elemento inmunopotenciador, en el que los codones que codifican la MMP-11 y el elemento inmunopotenciador se han optimizado para obtener una expresión potenciada del polipéptido de fusión en células humanas. En otras realizaciones, las composiciones comprenden la MMP-11 catalíticamente inactivada unida en el extremo C-terminal a un elemento inmunopotenciador. Las composiciones se pueden usar solas o en sinergia con vacunas contra otros antígenos asociados a tumores así como con tratamientos convencionales tales como radioterapia y quimioterapia.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MMP-11, en la que uno o más de los codones de nucleótidos que codifican la

MMP-11 que aparecen con una frecuencia baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en seres humanos han sido reemplazados por codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia mayor en los ácidos nucleicos que codifican las proteínas altamente expresadas en seres humanos (esto es, la secuencia de nucleótidos ha sido optimizada para una alta expresión del ácido nucleico en células de origen humano).

En una realización preferida del ácido nucleico, la MMP-11 codificada por la secuencia de nucleótidos incluye además una mutación que hace a la MMP-11 catalíticamente inactiva, en realizaciones particulares, la mutación está en el dominio de unión a zinc de la MMP-11.

El polinucleótido codifica una MMP-11 humana.

En otras realizaciones adicionales del ácido nucleico, el ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 4.

La presente invención proporcionad adicionalmente un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene una MMP-11 unida a un elemento inmunopotenciador o una parte sustancial del mismo. En realizaciones preferidas, uno o más de los codones de nucleótidos que codifican el polipéptido de fusión que aparecen con una frecuencia baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en seres humanos, han sido reemplazados con codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia mayor en los ácidos nucleicos que codifican las proteínas altamente expresadas en seres humanos.

El elemento inmunopotenciador es la LTB de *E. coli*. La LTB no incluye una secuencia señal. En otras realizaciones adicionales del ácido nucleico, la LTB está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N.º: 8.

En otras realizaciones adicionales, el polipéptido de fusión incluye la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N.º: 11.

La presente invención proporciona además un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la invención unido de manera operable a un promotor. La presente invención proporciona además una célula huésped que contiene una cualquiera de las realizaciones del vector de expresión anterior en su interior. La presente invención proporciona además un procedimiento, que comprende cultivar la célula huésped anterior en un medio de cultivo celular bajo condiciones para producir un polipéptido de fusión.

La presente invención proporciona adicionalmente un polipéptido de fusión que comprende una MMP-11 unida a un elemento inmunopotenciador como el que se muestra en la SEC ID N.º: 10.

La LTB incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 9.

La presente invención proporciona además una vacuna de polinucleótido que comprende un nucleótido de la invención

En realizaciones adicionales de la vacuna de polinucleótido, la vacuna incluye además uno o más adyuvantes genéticos. Tales adyuvantes genéticos incluyen, pero sin limitarse a ellos, moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86; citocinas proinflamatorias tales como interleucina-1 α (IL-1 α); factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y TNF- β); citocinas de Th1 tales como IL-2, IL-12, IL-15, e IL-18; citocinas de Th2 tales como IL-4, IL-5, e IL-10; factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF); IL-8; proteína 10 inducible por interferón- γ (γ IP-10);

proteína 1 α inhibidora de macrófagos (MIP-1 α); y RANTES.

5 En otras realizaciones adicionales de la vacuna de polinucleótido, la vacuna incluye además uno o más adyuvantes convencionales. Los adyuvantes convencionales incluyen, pero sin limitarse a ellos, sales mineral tales como fosfato o hidróxido de aluminio, adyuvantes derivados de bacterias tales como monofosforil lípido A, toxina colérica, muramil péptidos, partículas lipídicas tales como liposomas catiónicos y liposomas recubiertos con manano, adyuvantes emulsionantes tales como QS-21, y adyuvantes sintéticos tales como ubenimex.

La presente invención proporciona además una vacuna de polipéptido que comprende un polipéptido de fusión de la invención.

10 En otra realización adicional de la vacuna de polipéptido, la vacuna incluye uno o más adyuvantes moleculares capaces de modular la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1 o Th2. Tales adyuvantes moleculares incluyen, pero sin limitarse a ellos, moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86; citocinas proinflamatorias tales como interleucina-1 α (IL-1 α); factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y TNF- β); citocinas de Th1 tales como IL-2, IL-12, IL-15, e IL-18; citocinas de Th2 tales como IL-4, IL-5, e IL-10; factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF); IL-8; proteína 10 inducible por interferón- γ (iP-10); proteína 1 α inhibidora de macrófagos (MIP-1 α); y RANTES.

20 En otras realizaciones adicionales de la vacuna de polipéptido, la vacuna puede incluir uno o más adyuvantes convencionales. Los adyuvantes convencionales incluyen, pero sin limitarse a ellos, sales mineral tales como fosfato o hidróxido de aluminio, adyuvantes derivados de bacterias tales como monofosforil lípido A, toxina colérica, muramil péptidos, partículas lipídicas tales como liposomas catiónicos y liposomas recubiertos con manano, adyuvantes emulsionantes tales como QS-21, y adyuvantes sintéticos tales como ubenimex.

La presente invención proporciona además para el uso de un ácido nucleico, una secuencia de nucleótido de la invención en un medicamento para tratar un carcinoma en un individuo.

25 También se divulga un procedimiento para tratar un carcinoma en un individuo que comprende suministrar una vacuna de polinucleótido que incluye un ácido nucleico de la invención o un polipéptido de fusión de la invención; y administrar la vacuna para tratar el cáncer.

30 En realizaciones particulares del procedimiento anterior, el individuo se está sometiendo a uno o más tratamiento seleccionados del grupos constituido por quimioterapia, radioterapia y vacunación con un antígeno asociado a tumores. En otras realizaciones adicionales, el individuo tiene un carcinoma invasivo seleccionado del grupo constituido por mama, colon, cabeza y cuello, pulmón, ovario, páncreas, próstata, piel (carcinoma de células basales), útero (carcinoma de cuello uterino y carcinoma de endometrio) o el individuo tiene un carcinoma no invasivo que tiene riesgo de evolucionar a invasivo.

Definiciones

35 Tal como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se usan a lo largo de la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, se aplican las definiciones y abreviaturas siguientes:

40 El término "promotor" se refiere a un sitio de reconocimiento de una hebra de ADN al que se une la ARN polimerasa. El promotor forma un complejo de iniciación con la ARN polimerasa para iniciar y dirigir la actividad transcripcional de una secuencia de ácido nucleico situada aguas abajo del promotor. El promotor puede modificarse incluyendo secuencias activadoras denominadas "potenciadores" o secuencias inhibidoras denominadas "silenciadores" dentro del promotor. El término incluye además tanto los promotores que son inducibles como los promotores que son constitutivos.

45 El término "casete" se refiere a un nucleótido o secuencia génica que debe expresarse a partir de un vector, por ejemplo, codificando el nucleótido o secuencia génica la proteína cDkk-4. En general, un casete comprende una secuencia génica insertada en un vector que, en algunas realizaciones, proporciona secuencias regulatorias para expresar la secuencia de nucleótidos o génica. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos o génica proporciona las secuencias reguladoras para su expresión. En realizaciones adicionales, el vector proporciona algunas secuencias reguladoras y la secuencia de nucleótidos o génica proporciona otras secuencias reguladoras. Por ejemplo, el vector puede proporcionar un promotor para transcribir la secuencia de nucleótidos o génica y la secuencia de nucleótidos o génica proporciona una secuencia de terminación de la transcripción. Las secuencias reguladoras que pueden proporcionarse mediante un vector incluyen, pero sin limitarse a ellas, potenciadores, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias aceptoras y donadoras, intrones, secuencias de unión a ribosomas y secuencias de adición de poli(A).

55 El término "vector" se refiere a algunos medios mediante los cuales pueden introducirse fragmentos de ADN en

un organismo huésped o tejido huésped. Existen varios tipos de vectores que incluyen plásmidos, virus (incluidos adenovirus), bacteriófagos y cósmidos.

El término "MMP-11" hace referencia a la proteína o polipéptido MMP-11.

5 El término "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se refiere a una proteína que tiene al menos dos polipéptidos unidos covalentemente, donde un polipéptido viene de una secuencia o dominio de proteína y el otro polipéptido viene de otra secuencia o dominio de proteína. Las proteínas de fusión de la presente invención comprenden una MMP-11, y un segundo polipéptido, que comprende un elemento inmunopotenciador que es la subunidad B de la toxina termolábil (LTB) de E.coli y tiene una secuencia señal truncada.

10 La expresión "proteína de fusión de MMP-11" pretende ser una expresión general que se refiere a una proteína de fusión como se describe anteriormente. La expresión "MMP-11 recombinante" se refiere a una MMP-11 que ha sido modificada mediante ingeniería genética. Por ejemplo, la expresión incluye la MMP-11 catalíticamente inactiva y los polipéptidos de fusión de MMP-11 divulgados en el presente documento. Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se refieren a cualquier polímero de nucleótidos unidos unos a otros por enlaces fosfodiéster, por ejemplo, moléculas de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) de cualquier longitud. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen genes y sus fragmentos o porciones, sondas, oligonucleótidos y cebadores. El AND puede ser o ADN complementario (ADNc) o ADN genómico, por ejemplo, un gen que codifique una MMP-11 o una de sus variantes. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento.

15 Las expresiones "polinucleótido recombinante" o "ácido nucleico recombinante" se refieren a un polinucleótido que ha sido modificado mediante ingeniería genética.

El término "gen" se refiere tanto al ácido nucleico genómico que codifica el producto génico, que para muchos genes comprende una combinación de secuencias exónicas e intrónicas, como al ADN procedente del ARNm que codifica el producto génico, que no incluye secuencias intrónicas.

25 Las expresiones "con codones optimizados", "los codones de nucleótidos están optimizados para una expresión potenciada en seres humanos", "la secuencia de nucleótidos se ha optimizado para una expresión elevada" y similares para describir los polinucleótidos de la presente invención significan que uno o más de los codones de nucleótidos de la MPP-11 y/o el elemento inmunopotenciador que aparecen con una frecuencia baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en un organismo, han sido reemplazados por codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia mayor en los ácidos nucleicos que codifican las proteínas altamente expresadas en el organismo. El codón de nucleótidos para un aminoácido concreto con "frecuencia baja" es aquel codón de nucleótidos con la frecuencia de uso más baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en el organismo. El codón de nucleótidos para un aminoácido concreto con "frecuencia alta" es aquel codón de nucleótidos con la frecuencia de uso más alta o una frecuencia de uso que es mayor que la del codón de nucleótidos con la frecuencia más baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en el organismo.

30 El término "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los individuos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno, así como los que sean propensos a padecer el trastorno o aquellos en los que deba evitarse el trastorno.

35 Se pretende que los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención se utilicen como tratamientos para trastornos o afecciones asociados con la sobreexpresión de la MMP-11 y que están caracterizados por una proliferación celular aberrante, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón.

40 La expresión "cantidad eficaz" significa que se introduce suficiente composición de vacuna para producir los niveles adecuados del polipéptido, de modo que se obtiene una respuesta inmunitaria. Un experto en la técnica reconoce que este nivel puede variar.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un mapa del vector pV1 InsB-mMMP-11. Se indican el promotor CMV humano y el ADNc de MMP-11 de ratón.

50 La Figura 2 muestra la expresión de MMP-11 de ratón. Se transfectaron células HeLa con pV1InsB-MMP-11 y se analizaron los extractos mediante transferencia western. Se detectó una banda correspondiente al peso molecular de la MMP-11.

55 La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico con codones optimizados que codifica una MMP-11 de ratón catalíticamente inactiva (mMMP-11opt) (SEC ID N.º: 13). Los nucleótidos correspondientes a la mMMP-11 catalíticamente inactiva, con codones optimizados, están en letra más gruesa

y los nucleótidos adicionales para el polienlazador que comprende un sitio *Xba*I están subrayados. Los nucleótidos para los sitios de clonación, secuencia de Kozak, y codones de terminación se muestran en cursiva. El codón de iniciación de la mMMP-11 está en negrita.

5 La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico con codones optimizados que codifica una mMMP-11 catalíticamente inactiva unida a una LTB de *E. coli* (mMMP-11-LTBopt) (SEC ID N.º: 14). Los nucleótidos correspondientes a la mMMP-11 catalíticamente inactiva, con codones optimizados, están en letra más gruesa y los nucleótidos adicionales para el polienlazador que comprende un sitio *Xba*I están subrayados. Los nucleótidos que codifican la secuencia de la LTB de *E. coli* están en letras minúsculas. Los nucleótidos para los sitios de clonación, secuencia de Kozak, y codones de terminación están en cursiva.

10 La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión de la mMMP-11-LTBopt catalíticamente inactiva (SEC ID N.º: 15). Los aminoácidos que comprenden el polipéptido correspondiente a la MMP-11 catalíticamente inactiva están en letras más gruesas y la secuencia de la LTB está en cursiva. Los aminoácidos codificados por el polienlazador están subrayados. La Figura 6A muestra un mapa del vector pV1J-mMMP-11(cat)-opt que comprende un polinucleótido con codones optimizados que codifica la mMMP-11 catalíticamente inactiva.

15 La Figura 6B muestra un mapa del vector pV1J-mMMP-11(cat)-LTBopt que comprende un polinucleótido con codones optimizados que codifica la mMMP-11 catalíticamente inactiva unida a la LTB de *E. coli*.

20 La Figura 7 muestra una transferencia western que muestra la expresión de pV1JnsA-MMP-11(cat)-LTBopt en células HeLa transfectadas con el pV1JnsA-MMP-11(cat)-LTBopt usando anticuerpos anti-MMP-11 o anti-LTB.

25 La Figura 8 muestra la respuesta inmunitaria mediada por células desencadenada por mMMP-11, mMMP-11 opt y mMMP-11(cat)-LT-Bopt. Seis ratones BALB/c fueron inmunizados con cuatro inyecciones semanales de electroporación de ADN (DNA-EP). Se midió la respuesta inmunitaria por tinción intracelular para IFN γ usando péptidos que cubrían el extremo C de la proteína mMMP-11. Los puntos representan el % de CD8+IFN γ + para cada ratón solo. La barra horizontal representa la media geométrica del grupo. La Figura 9 muestra la respuesta humoral desencadenada por la mMMP-11 catalíticamente inactiva y la mMMP-11(cat)-LTBopt. Ratones BALB/c fueron inmunizados con cuatro inyecciones semanales de electroporación de ADN (DNA-EP). Se midió la presencia de anticuerpos por transferencia western. La detección de una banda de 50 KDa correspondiente a la mMMP-11 indica una respuesta humoral contra MMP-11.

30 La Figura 10 muestra que la mMMP-11 está sobreexpresada en adenomas de colon en ratón inducidos por DMH. Ratones A/J fueron tratados con seis inyecciones IP de DMH. Cinco semanas después, se analizó tejido de colon por inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) y transferencia western. Veh significa vehículo (PBS).

35 La Figura 11A muestra una representación esquemática del experimento realizado para demostrar la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat)-LTBopt para la prevención del cáncer de colon. Ratones A/J fueron tratados con seis inyecciones IP de DMH. Un grupo de ratones se dejó sin tratar (naive), un segundo grupo fue vacunado con los 50 μ g del plásmido pV1J-mMMP-11(cat)-LTBopt. De siete a ocho semanas después de la última inyección de DMH, los ratones fueron sacrificados y se analizó el colon al microscopio para evaluar la formación de criptas aberrantes (ACF) (Figuras 11B y 11C), pólipos (Figura 11D) y adenomas (Figura 11E).

40 La Figura 11B muestra la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat)-LTBopt para inhibir la ACF. Los puntos vacíos indican el número de formaciones por ratón; los puntos rellenos indican la media geométrica del grupo. Se indica el análisis estadístico (prueba de la T de Student).

45 La Figura 11C muestra la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat)-LTBopt para inhibir la ACF. Los puntos vacíos indican el número de formaciones por ratón; los puntos rellenos indican la media geométrica del grupo. Se indica el análisis estadístico (prueba de la T de Student).

La Figura 11D muestra la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat)-LTBopt para inhibir pólipos. Los puntos vacíos indican el número de formaciones por ratón; los puntos rellenos indican la media geométrica del grupo. Se indica el análisis estadístico (prueba de la T de Student).

50 La Figura 11E muestra la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat)-LTBopt para inhibir adenomas. Los puntos vacíos indican el número de formaciones por ratón; los puntos rellenos indican la media geométrica del grupo. Se indica el análisis estadístico (prueba de la T de Student).

55 La Figura 12A muestra la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna genética anti-mMMP-11. Ratones BALB/c fueron tratados con seis inyecciones IP de DMH. Un grupo de ratones se dejó sin tratar (naive) y un segundo grupo fue vacunado con los 50 μ g del plásmido pV1J-mMMP-11(cat)-LTBopt. La respuesta inmunitaria se determinó por tinción intracelular para IFN γ . Los puntos negros representan el % de

CD8+IFN γ + para cada ratón solo. La barra horizontal representa la media geométrica del grupo.

La Figura 12B muestra la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna genética anti-mMMP-11. Ratones BALB/c fueron tratados con seis inyecciones IP de DMH. Un grupo de ratones se dejó sin tratar (naive) y un segundo grupo fue vacunado con los 50 μ g del plásmido pV1J-mMMP-11(cat-)-LTBopt. La respuesta inmunitaria se midió usando un ensayo de linfocitos citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés), en el que se estimularon células efectoras durante siete días con péptidos de mMMP-11. Se usaron células de martocitoma pS15 sin cargar o cargadas con péptidos de mMMP-11 como diana.

La Figura 13A muestra la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat-)-LTBopt en ratones BALB/c para inhibir la ACF. De siete a ocho semanas después de la última inyección de DMH, los ratones fueron sacrificados y se analizó el colon al microscopio para evaluar la ACF. Los puntos vacíos indican el número de formaciones por ratón; los puntos rellenos indican la media geométrica del grupo. Se indica el análisis estadístico (prueba de la T de Student).

La Figura 13B muestra la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat-)-LTBopt en ratones BALB/c para inhibir la ACF. De siete a ocho semanas después de la última inyección de DMH, los ratones fueron sacrificados y se analizó el colon al microscopio para evaluar la ACF. Los puntos vacíos indican el número de formaciones por ratón; los puntos rellenos indican la media geométrica del grupo. Se indica el análisis estadístico (prueba de la T de Student).

La Figura 13C muestra la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat-)-LTBopt en ratones BALB/c para inhibir pólipos. De siete a ocho semanas después de la última inyección de DMH, los ratones fueron sacrificados y se analizó el colon al microscopio para evaluar los pólipos. Los puntos vacíos indican el número de formaciones por ratón; los puntos rellenos indican la media geométrica del grupo. Se indica el análisis estadístico (prueba de la T de Student).

La Figura 13D muestra la eficacia terapéutica de la vacuna genética de mMMP-11(cat-)-LTBopt en ratones BALB/c para inhibir adenomas. De siete a ocho semanas después de la última inyección de DMH, los ratones fueron sacrificados y se analizó el colon al microscopio para evaluar los adenomas. Los puntos vacíos indican el número de formaciones por ratón; los puntos rellenos indican la media geométrica del grupo. Se indica el análisis estadístico (prueba de la T de Student).

La Figura 14 muestra la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica la MMP-11 humana catalíticamente inactiva (hMMP-11(cat)-opt) en la que los codones han sido optimizados para expresión en seres humanos (SEC ID N.º: 4).

La Figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos de la hMMP-11 catalíticamente inactiva (SEC ID N.º: 5).

La Figura 16 muestra la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que comprende una hMMP-11 catalíticamente inactiva unida a la LTB de *E. coli* en la que los codones que codifican tanto la MMP-11 como la LTB han sido optimizados para expresión en seres humanos (SEC ID N.º: 12) (hMMP-11 (cat-) -LTBopt). Los codones que codifican los aminoácidos 1 a 21 de la LTB no están incluidos en el polipéptido de fusión. Los nucleótidos correspondientes a la hMMP-11 catalíticamente inactiva, con codones optimizados, están en letra más gruesa y los nucleótidos adicionales para el polienlazador que comprende un sitio *Xba*I están subrayados. Los nucleótidos que codifican la secuencia de la LTB de *E. coli* están en letras minúsculas.

La Figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión de la hMMP-11-LTB catalíticamente inactiva (SEC ID N.º: 10). Los aminoácidos que comprenden la MMP-11 catalíticamente inactiva están en letras mayúsculas, los aminoácidos que comprenden la LTB están en cursiva, y los aminoácidos codificados por el polienlazador están subrayados. El codón de iniciación está en negrita.

La Figura 18 muestra un mapa del vector pV1J-hMMP-11(cat)-opt que comprende un polinucleótido con codones optimizados que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva.

La Figura 19A muestra que la DMH no interfiere con la respuesta inmunitaria CD8+ de ratones BALB/c.

La Figura 19B muestra que la DMH no interfiere con la respuesta inmunitaria CD8+ de ratones A/J.

La Figura 19C muestra que la DMH no interfiere con la respuesta inmunitaria CD4+ de ratones A/J.

La Figura 20 muestra un mapa del vector pV1J-hMMP-11(cat-)-LTBopt (Véase la SEC ID N.º. 18) que comprende un polinucleótido con codones optimizados que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva unida a la LTB de *E. coli*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones que puede usarse como vacunas anti-MMP-11 para inhibir

tumores y cánceres que sobreexpresan MMP-11 en un individuo, en particular, para inhibir carcinomas invasivos que sobreexpresan MMP-11 tales como carcinomas particulares de la mama, colon, cabeza y cuello, pulmón, ovario, páncreas, próstata, piel (carcinoma de células basales), útero (carcinoma de cuello uterino y carcinoma de endometrio) o carcinomas no invasivos que tienen riesgo de evolucionar a invasivos. La vacuna anti-MMP-11 o
 5 vacuna anti-antígenos asociados a tumores (anti-TAA) puede usarse, por ejemplo, en un régimen monoterapéutico que se dirija a células tumorales y al compartimento estromal; en un régimen multiterapéutico con otra vacuna anti-TAA, que se dirija a células tumorales a través de respuesta inmunitaria multiespecífica mediada por células y al compartimento estromal; en un régimen multiterapéutico con otras moléculas o adyuvantes; en un tratamiento que incluye quimioterapia, siendo el fundamento hacer que la estructura estromal sea más permeable a agentes
 10 citotóxicos; en un tratamiento que incluye radioterapia; y, en uno cualquiera una de los tratamientos anteriores, en los que la MMP-11 se proporciona como parte de un polipéptido multiepitopo o minigen. Las vacunas anti-MMP-11 de la presente invención puede ser una vacuna de polipéptido, o preferiblemente, una vacuna de polinucleótido.

Como se muestra en los Ejemplos, se ha observado que administrar una vacuna anti-MMP-11 a ratones con tumores colónicos, que habían sido inducidos con 1,2-dimetilhidrazina (DMH), provocaba una reducción significativa
 15 de la progresión de la carcinogénesis inducida por DMH en el tejido de colon de los ratones. En cepas de ratones susceptibles, tales como A/J, pero también en menor medida en BALB/c, la progresión de la carcinogénesis inducida por DMH en tejido de colon pasa por diferentes etapas: (1) formación de criptas aberrantes (ACF); (2) Adenoma; (3) Pólipo; y (4) Adenocarcinoma (Véase Birf, Cancer Lett. 93(1): 55-71 (1995)). Los inventores encontraron que la MMP-11 está sobreexpresada en el tejido tumoral inducido por DMH, lo que sugiere la idoneidad de la carcinogénesis inducida por DMH en ratones como un modelo para el tratamiento y la vacunación anti-MMP-11. Los inventores encontraron después que una vacuna genética que comprende un ácido nucleico que codifica la MMP-11 de ratón (mMMP-11), en la que la mMMP-11 había sido catalíticamente inactivada introduciendo una mutación puntual en el dominio de unión a Zn del sitio catalítico, inducía una respuesta inmunitaria en ratones y que la respuesta inmunitaria se potenciaba adicionalmente cuando el ácido nucleico que codifica la mMMP-11 catalíticamente inactiva estaba unido a un ácido nucleico que codifica la subunidad B de la toxina termolábil (LTB) de
 20 *E. coli* sin el péptido señal, y los codones que codifican la MMP-11 estaban optimizados para una expresión potenciada en el ratón y los codones que codifican la LTB estaban optimizados para una expresión potenciada en seres humanos. Finalmente, los inventores encontraron que la vacuna genética era eficaz para efectuar una reducción en todas las fases de la carcinogénesis inducida por DMH en el ratón. Por lo tanto, a la luz de los resultados del modelo de ratón, la presente invención proporciona vacunas anti-MMP-11 que comprenden o un polinucleótido que codifica la MMP-11 o el polipéptido de MMP-11, preferiblemente una vacuna anti-MMP-11 que tenga una cualquiera de las realizaciones que se mencionan anteriormente.

En su realización más básica, la presente invención proporciona un ácido nucleico o polinucleótido, que comprende una molécula de ácido nucleico o de polinucleótido que codifica una MMP-11 o una variante debido a la
 35 degeneración del código genético, la ingeniería genética como se describe a continuación, o ambos, bajo el control de o unido de forma operable a un promotor heterólogo adecuado en el que el ácido nucleico que codifica la MMP-11 ha sido modificado para que incluya una mutación que haga a la MMP-11 catalíticamente inactiva. La mutación que hace a la MMP-11 catalíticamente inactiva puede introducirse en el polinucleótido mediante ingeniería genética. Los polinucleótidos recombinantes que codifican la MMP-11 catalíticamente inactiva son procedentes de seres
 40 humanos en los que el polinucleótido se modifica para incluir una mutación que haga a la MMP-11 codificada catalíticamente inactiva. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la MMP-11 humana (hMMP-11) se establece en el N.º de acceso de GenBank NM_005940 (SEC ID N.º: 1). El polinucleótido recombinante que codifica la hMMP-11 se modifica como se muestra más adelante para que codifique variantes que pueden usarse en las vacunas anti-MMP-11 de la presente invención.

La MMP-11 codificada por el polinucleótido es una variante catalíticamente inactiva de la MMP-11. Un polinucleótido que codifica una MMP-11 catalíticamente inactiva puede producirse modificando mediante ingeniería genética uno o más de los codones de nucleótidos que codifican los aminoácidos conservados que comprenden el sitio de unión a zinc H E X X H X X G X X H (SEC ID N.º: 3) de la MMP-11 (para la hMMP-11, aminoácidos 215 a 225 de la SEC ID N.º: 5) a un aminoácido alternativo para producir un polinucleótido recombinante que codifique una MMP-11
 50 catalíticamente inactiva. Por ejemplo, como se muestra en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º: 4 que codifica una hMMP-11 catalíticamente inactiva, el codón de nucleótidos GAA que codifica el ácido glutámico conservado en la posición del aminoácido 216 de la hMMP-11 se cambió por el codón de nucleótidos GTG que codifica el aminoácido valina para producir una hMMP-11 catalíticamente inactiva con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 5, en la que el aminoácido de la posición 216 es valina. Noël y cols., Oncogene 19: 1605-1612 (2000)) han demostrado que cambiar el codón de nucleótidos de la posición 216 por un codón de nucleótidos que codifica alanina hace a la hMMP-11 catalíticamente inactiva y que cambiar el codón de nucleótidos que codifica el ácido glutámico en la posición del aminoácido 220 de la región correspondiente de la mMMP-11 por un codón de nucleótidos que codifica alanina hace a la mMMP-11 catalíticamente inactiva. Aunque el codón de nucleótidos que codifica el ácido glutámico de la posición de aminoácido número dos de la SEC ID N.º: 3 ha sido
 60 cambiado por un codón de nucleótidos que codifica valina o alanina para producir una MMP-11 catalíticamente inactiva, el codón de nucleótidos también puede cambiarse a otros aminoácidos o los codones que codifican uno o más de los otros aminoácidos conservados del dominio de unión a Zn pueden cambiarse para que codifiquen otros aminoácidos sin alejarse de la invención.

5 Se ha demostrado que la optimización de los codones de los genes o unidades de transcripción que codifican para polipéptidos concretos da lugar a un aumento de la expresión del polipéptido codificado, es decir, a un aumento de la traducción del ARNm que codifica el polipéptido. En el caso de una vacuna de polinucleótido, el aumento de la expresión del polipéptido codificado produce más polipéptido codificado, lo que puede dar lugar a un aumento de la inmunogenicidad de la vacuna *in vivo*, que a su vez, puede potenciar la eficacia de la vacuna. En el contexto de la optimización de codones, el término "expresión" y sus variantes se refieren a la traducción del ARNm que codifica el polipéptido y no a la transcripción del polinucleótido que codifica el polipéptido. El término "gen" como se usa en el presente documento se refiere tanto al ADN o ARN genómico que codifica un polipéptido como al ADNc que codifica el polipéptido.

10 La optimización de codones es un procedimiento par buscar mejorar la expresión heteróloga de un gen cuando ese gen se mueve a un entorno genético extraño que muestra un uso de los codones de nucleótidos diferente del del entorno genético original o mejorar la expresión ectópica de un gen en su entorno genético original cuando el gen incluye de forma natural uno o más codones de nucleótidos que no se usan normalmente en genes originales del entorno genético que codifica genes altamente expresados. En otras palabras, la optimización de codones implica reemplazar aquellos codones de nucleótidos de un gen que se usan con una frecuencia relativamente baja en un ambiente genético u organismo en particular con codones de nucleótidos que se usan en genes que se expresan con una frecuencia mayor en el entorno genético u organismo. De ese modo, la expresión (traducción) del producto génico (polipéptido) aumenta. Se supone que los codones de nucleótidos que aparecen con mayor frecuencia en genes altamente expresados se traducen más eficientemente que los codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia baja.

En general, los procedimientos para optimizar codones de nucleótidos para un gen en particular dependen de la identificación de la frecuencia de los codones de nucleótidos para cada uno de los aminoácidos usados en genes altamente expresados en un organismo y el reemplazo posterior de esos codones de nucleótidos en un gen de interés con baja frecuencia en los genes altamente expresados con codones de nucleótidos que se identifican como usados en los genes altamente expresados (Véase, por ejemplo, Lathe, Synthetic Oligonucleotide Probes Deduced from Amino Acid Sequence Data: Theoretical and Practical Considerations, J. Molec. Biol.: 183: 1-12 (1985); Nakamura y cols., Nuc. Acid Res. 28: 292 (2000); Fuglsang, Protein Expression & Purification 31: 247-249 (2003). Existen numerosos programas de ordenador que analizarán automáticamente los codones de nucleótidos de un ácido nucleico de un organismo que codifican un gen y sugerirán codones de nucleótidos para reemplazar codones de nucleótidos, que aparecen con frecuencia baja en el organismo, con codones de nucleótidos que se encuentran en genes que son altamente expresados en el organismo. Para mayor comodidad, se muestra a continuación en la Tabla 1 una tabla del uso de codones de nucleótidos para seres humanos de Nakamura (ibíd.) y que identifica codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en seres humanos, codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia mayor en los ácidos nucleicos que codifican las proteínas altamente expresadas en seres humanos.

Tabla 1

Codón	Aminoácido	Frecuencia	Codón	Aminoácido	Frecuencia
UUU	F	17,4	UCU	C	15,1
UUC	F	20,4	UCC	C	17,7
UUA	L	7,5	UCA	C	12,1
UUG	L	12,8	UCG	C	4,5
CUU	L	13,1	CCU	P	17,5
CUC	L	19,7	CCC	P	20,0
CUA	L	7,1	CCA	P	16,9
CUG	L	39,9	CCG	P	7,0
AUU	I	15,8	ACU	T	13,0
AUC	I	20,9	ACC	T	19,0
AUA	I	7,4	ACA	T	15,0
AUG	M	22,0	ACG	T	5,1
GUU	V	11,0	GCU	A	18,5
GUC	V	14,6	GCC	A	28,1
GUA	V	7,1	GCA	A	15,9
GUC	V	28,4	GCG	A	7,5
UAU	Y	12,1	UGU	C	10,4
UAC	Y	15,3	UGC	C	12,6
UAA	*	1,0	UGA	*	1,6
UAG	*	0,8	UGG	W	13,2

(cont.)

CAU	H	10,8	CGU	R	4,6
CAC	H	15,1	CGC	R	10,6
CAA	Q	12,1	CGA	R	6,2
CAG	Q	34,2	CGG	R	11,6
AAU	N	16,7	AGU	C	12,1
AAC	N	19,1	AGC	C	19,4
AAA	K	24,1	AGA	R	11,9
AAG	K	32,0	AGG	R	11,9
GAU	D	21,7	GGU	G	10,8
GAC	D	25,2	GGC	G	22,5
GAA	E	28,6	GGA	G	16,4
GAG	E	39,7	GGG	G	16,5

* Codón de terminación

Por lo tanto, en realizaciones adicionales, se proporciona un polinucleótido recombinante en el que uno o más de los codones de nucleótidos que codifican los aminoácidos que comprenden la MMP-11 se optimizan para potenciar la expresión de la MMP-11 codificada y, de este modo, en el caso de una vacuna anti-MMP-11, potenciar la eficacia de la vacuna anti-MMP-11. Esto es, uno o más de los codones de nucleótidos que codifican la MMP-11 y/o el elemento inmunopotenciador que aparecen con una frecuencia baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en un organismo, han sido reemplazados con codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia mayor en los ácidos nucleicos que codifican las proteínas altamente expresadas en el organismo. Preferiblemente, los codones de nucleótidos están optimizados para la expresión potenciada de la MMP-11 en seres humanos. Sin embargo, los polinucleótidos recombinantes con codones optimizados para la expresión potenciada en otro organismo, por ejemplo, primates, son equivalente a los polinucleótidos recombinantes con codones optimizados para la expresión potenciada en seres humanos. Cuando existen múltiples codones de nucleótidos para un aminoácido concreto de la MMP-11 y dos o más de los codones de nucleótidos tienen la misma frecuencia de uso relativa en genes humanos altamente expresados o una frecuencia de uso en genes humanos altamente expresados mayor que la del codón de nucleótidos que tiene la frecuencia de uso más baja en genes humanos altamente expresados, cada uno de los codones de nucleótidos para los aminoácidos de la MMP-11 puede ser, independientemente, cualquiera de los codones de nucleótidos de la misma frecuencia de uso o frecuencia de uso mayor que la del codón de nucleótidos que tiene la frecuencia de uso más baja. No todos los codones de nucleótidos del polinucleótido con codones optimizados que codifica la MMP-11 tienen que ser el codón de nucleótidos que tiene la frecuencia de uso mayor en genes humanos altamente expresados. Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos de la hMMP-11 que es catalíticamente inactiva y en la que los codones que codifican la hMMP-11 catalíticamente inactiva han sido optimizados para la expresión en seres humanos se muestra en la SEC ID N.º: 6.

El modelo de ratón mostró que la eficacia de una vacuna anti-MMP-11 que comprende un polinucleótido recombinante que codifica una mMMP-11 catalíticamente inactiva en la que los codones de nucleótidos que codifican la mMMP-11 se optimizaron para una expresión potenciada en el ratón (mMMP-11-opt) se potenciaba adicionalmente cuando el codón de nucleótidos que codifica el aminoácido carboxiterminal de la mMMP-11-opt estaba unido o fusionado con codones de nucleótidos que codifican una parte sustancial de la toxina termolábil B (LTB) de *E. coli* inmunopotenciadora para producir un polipéptido de fusión que comprende la mMMP-11 y la LTB de *E. coli*. Por lo tanto el polinucleótido recombinante comprende un ácido nucleico que codifica la MMP-11 catalíticamente inactiva unida a un ácido nucleico que codifica un polipéptido elemento inmunopotenciador o una parte sustancial del mismo (polipéptido de fusión MMP-11). El polinucleótido recombinante comprende un ácido nucleico que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva unida a un ácido nucleico que codifica un elemento inmunopotenciador que es la LTB de *E. coli* de forma que el polinucleótido codifica una proteína de fusión hMMP-11-LTB. El ácido nucleico que codifica la LTB no incluye los codones que codifican el péptido señal de la LTB. La secuencia de ácido nucleico que codifica la LTB de *E. coli* está disponible en GenBank con el N.º de acceso AB011677 y la secuencia de aminoácidos para la LTB de *E. coli* se muestra en GenBank con el N.º de acceso BAA25726. El péptido señal incluye los residuos de aminoácido 1 a 2} de la secuencia de aminoácidos mostrada en BAA25726. La secuencia de nucleótidos de la LTB de *E. coli* sin el péptido señal se muestra en la SEC ID N.º: 7 y su secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 9. La secuencia de polinucleótidos que codifica la LTB de *E. coli* sin el péptido señal y en la que los codones de nucleótidos que codifican la LTB se han optimizado para una expresión potenciada en seres humanos se muestra en la SEC ID N.º: 8. En una realización particularmente preferida, los codones de nucleótidos del polinucleótido que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva y la LTB están optimizados para la expresión en seres humanos.

Por lo tanto, a la luz de lo anterior, la presente invención proporciona además un ácido nucleico o polinucleótido recombinante que codifica un sólo polipéptido de fusión que comprende una MMP-11 catalíticamente inactiva unida

- a una LTB con la secuencia señal truncada. Un ejemplo de un polinucleótido de ese tipo comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende los aminoácidos de la SEC ID N.º: 5 (hMMP-11 catalíticamente inactiva) y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 8 (LTB de *E. coli* sin péptido señal). El polinucleótido puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º: 4 que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva y la SEC ID N.º: 7 que codifica la LTB de *E. coli* sin péptido señal o la SEC ID N.º: 8 (polinucleótido que codifica la LTB de *E. coli* sin péptido señal con codones optimizados para expresión potenciada en seres humanos). Como ejemplo, el polinucleótido puede codificar un polipéptido de fusión hMMP-11-LTB catalíticamente inactivo que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 10. Un polipéptido de ese tipo puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N.º: 11.
- En una realización preferida, los codones de nucleótidos de una cualquiera de los ácidos nucleicos o polinucleótidos divulgados en el presente documento, están optimizados para una expresión potenciada del polipéptido recombinante codificado en ellos en seres humanos. Esto es, uno o más de los codones de nucleótidos de los ácidos nucleicos o polinucleótidos recombinantes que aparecen con una frecuencia baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en seres humanos han sido reemplazados con codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia mayor en los ácidos nucleicos que codifican las proteínas altamente expresadas en seres humanos. Es adicionalmente preferible en el caso de polinucleótidos recombinantes que codifican uno cualquiera de los polipéptidos de fusión divulgados en el presente documento, que los codones de nucleótidos de los polinucleótidos que codifican la LTB que comprende el polipéptido recombinante se optimicen también para una expresión potenciada del polipéptido de fusión en seres humanos. Un ejemplo de un polinucleótido recombinante tal comprendería la secuencia de polinucleótidos con codones optimizados de la SEC ID N.º: 6 que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva y la secuencia de nucleótidos con codones optimizados de la SEC ID N.º: 8 que codifica la LTB de *E. coli* sin péptido señal. Como ejemplo, el polinucleótido recombinante que codifica el polipéptido de fusión de hMMP-11-LTB catalíticamente inactivo, con codones optimizados tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N.º: 12.
- La presente invención proporciona además polipéptidos recombinantes que comprenden una MMP-11 catalíticamente inactiva, en los que uno o más de los aminoácidos conservados que comprenden el sitio de unión a zinc H E X X H X X G X X H (SEC ID N.º: 3) de la MMP-11 se cambian por un aminoácido alternativo. Por ejemplo, como se muestra en la SEC ID N.º: 5 para hMMP-11, en la que el ácido glutámico conservado en la posición 216 de la hMMP-11 se cambió por el aminoácido valina para producir una MMP-11 catalíticamente inactiva. el polipéptido de MMP-11 catalíticamente inactiva comprende un polipéptido de fusión en el que la MMP-11 está unida en su extremo carboxi a un polipéptido elemento inmunopotenciador (polipéptido de fusión de MMP-11). El polipéptido elemento inmunopotenciador es la LTB de *E. coli*. La LTB no incluye su péptido señal. Un ejemplo de un polipéptido de fusión de MMP-11 comprende la hMMP-11 catalíticamente inactiva que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 5 unida en su extremo carboxi al extremo amino del polipéptido de la LTB de *E. coli* sin péptido señal que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 7. El polipéptido de fusión de MMP-11 puede estar codificado, por ejemplo; por el polinucleótido mostrado en la SEC ID N.º: 11 o el polinucleótido con codones optimizados mostrado en la SEC ID N.º: 12.
- La presente invención proporciona además vectores que comprenden al menos una de las moléculas de ácido nucleico de la invención (en lo sucesivo, "polinucleótido recombinante"), preferiblemente en los que el precursor del ácido nucleico este unido de forma operable a un promotor heterólogo. Estos vectores puede comprender ADN o ARN. Para la mayoría de los fines Se prefieren plásmidos de ADN o vectores de expresión víricos. Los vectores de expresión típicos incluyen plásmidos, virus modificados, bacteriófagos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras y otras formas de ADN episomal o integrado, cualquiera de las cuales expresa uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes que se divulgan en el presente documento. Preferiblemente, los codones de nucleótidos que codifican la una cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente están optimizados para la expresión potenciada en seres humanos.
- Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento, en el que el ADN preferiblemente tiene codones optimizados para la expresión potenciada en seres humanos y está unido de forma operable a un promotor heterólogo puede usarse para la expresión del uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento en una célula huésped recombinante. Tales células huésped recombinantes pueden cultivarse bajo condiciones adecuadas para producir uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento. Los vectores de expresión incluyen, pero sin limitarse a ello, vectores de clonación, vectores de clonación modificados, plásmido especialmente diseñados o virus especialmente diseñados. Los vectores de expresión descritos en los ejemplos son vectores de expresión aceptables.
- Los ácidos nucleicos de la presente invención, preferiblemente, están juntos en un casete de expresión que comprende secuencias que permiten la expresión eficiente de uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento codificadas en ellos en una célula humana. El casete preferiblemente contiene secuencias de control transcripcionales y traduccionales homólogas o heterólogas unidas de forma operable al ácido nucleico. Tales secuencias de control incluyen al menos un promotor de la transcripción (constitutivo o inducible) y secuencias de terminación de la transcripción y puede incluir adicionalmente otros elementos reguladores tales como potenciadores de la transcripción, secuencias de unión a ribosomas, secuencias de empalme y similares. En la

mayoría de las realizaciones, el promotor es un promotor heterólogo; sin embargo, en realizaciones particulares, el promotor puede ser el promotor original de la MMP-11. En una realización especialmente útil, el promotor es el promotor temprano inmediato constitutivo del citomegalovirus con o sin la secuencia intrónica A (CMV), aunque los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de una variedad de otros promotores conocidos tales como el promotor fuerte de la inmunoglobulina, el promotor de repeticiones terminales largas del virus del sarcoma de Rous, el promotor del antígeno T pequeño o grande del SV40, o similares. Los terminadores transcripcionales incluyen el terminador de la hormona de crecimiento bovina, aunque pueden usarse también otros terminadores transcripcionales conocidos tales como las secuencias de terminación del SV40. Los plásmidos pV1JnsB y pV1JnsA, cada uno de los cuales contiene el promotor del citomegalovirus (CMV) de la región inmediata/temprana y un potenciador con el intrón A seguido de un sitio de clonación y la señal de poliadenilación BGH, son ejemplos de un vector de expresión útil. La MMP-11 en una cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas puede clonarse en el sitio de clonación para completar la expresión del casete.

Los vectores de expresión de mamíferos comercialmente disponibles que son adecuados para la expresión de uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento incluyen, pero sin limitarse a ellos, pV1JnsA, pV1JnsB, pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, AC), pcDNA3.neo (Invitrogen), pcDNA3.1 (Invitrogen), pcDNA3.1/Myc-His (Invitrogen), pCI-neo (Promega, Madison, WI), pLITMUS28, pLITMUS29, pLITMUS38 y pLITMUS39 (New England Biolabs, Beverly, MA), pcDNA1, pcDNA1amp (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pMCneo (Stratagene, La Jolla, CA), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSVneo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUcTag (ATCC 37460), e IZD35 (ATCC 37565).

Asimismo, puede usarse una variedad de vectores de expresión bacterianos para expresar uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento en células bacterianas. Los vectores de expresión bacterianos comercialmente disponibles que pueden ser adecuados para la expresión incluyen, pero sin limitarse a ellos, pCR2.1 (Invitrogen), pET11a (Novagen, Madison, WI), lambda gt11 (Invitrogen), y pKK223-3 (Pharmacia).

Asimismo, puede usarse una variedad de vectores de expresión de células fúngicas para expresar uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento en células fúngicas. Los vectores de expresión de células fúngicas comercialmente disponibles que son adecuados para la expresión incluyen, pero sin limitarse a ellos, pYES2 (Invitrogen) y el vector de expresión de Pichia (Invitrogen).

Asimismo, puede usarse una variedad de vectores de expresión de células de insectos para expresar uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento en células de insectos. Los vectores de expresión de células de insectos comercialmente disponibles que pueden ser adecuados para la expresión incluyen, pero sin limitarse a ellos, pBlueBacIII y pBlueBacHis2 (Invitrogen), y pAcG2T (Pharmingen).

Los vectores víricos que pueden usarse para la expresión de uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento en células de mamífero incluyen, pero sin limitarse a ellos, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de herpesvirus, vectores del virus Sindbis, vectores del virus del bosque Semliki, vectores de parvovirus, vectores de poxvirus (tales como el virus vacuna, el virus de la viruela aviar, el virus de la viruela en canarios, y similares), vectores de retrovirus, vectores de bacteriófagos y vectores de baculovirus. Muchos de los vectores víricos para producir virus recombinantes que codifican uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes del presente documento están comercialmente disponibles.

En las realizaciones actualmente preferidas, el vector vírico usado para producir virus recombinantes es un vector adenovírico o un plásmido, aunque también puede usarse ADN lineal unido a un promotor, u otros vectores, tales como vectores retrovíricos o lentivíricos de virus adenoasociados o virus vacuna modificados. Si el vector elegido es un adenovirus, actualmente se prefiere que el vector sea uno de los llamados vectores adenovíricos de primera generación. Estos vectores adenovíricos se caracterizan por tener una región génica E1 no funcional, y preferiblemente una región génica E1 adenovírica eliminada. En algunas realizaciones, el casete de expresión está insertado en la posición en la que el gen E1 adenovírica se localiza normalmente. Además, estos vectores tienen opcionalmente una región E3 no funcional o eliminada. También se prefiere que el genoma del adenovirus usado tenga eliminadas tanto la región E1 como la E3 (AE1E3).

Los vectores de adenovirus pueden multiplicarse en líneas celulares conocidas que expresan el gen E1 vírico, tales como las células 293, o las células PERC.6, o en líneas celulares derivadas de células 293 o PERC.6 que están modificadas temporalmente o de forma estable para que expresen una proteína adicional. Por ejemplo, cuando se usan constructos que tienen una expresión génica controlada, tal como un sistema de promotor regulable por tetraciclina, la línea celular puede expresar componentes implicados en el sistema regulatorio. Un ejemplo de una línea celular de ese tipo es TRex-293, se conocen otras en la técnica.

Para mayor comodidad en la manipulación del vector adenovírico, el adenovirus puede estar en forma de plásmido lanzadera. Esta invención también se refiere a un vector plásmido lanzadera, que comprende una parte de plásmido y una parte de adenovirus, comprendiendo la parte de adenovirus un genoma adenovírico que tiene un E1 eliminado y opcionalmente una eliminación de E3, y tiene un casete de expresión insertado que comprende un ácido nucleico

que codifica un polipéptido de MMP-11 catalíticamente inactiva o un polipéptido de fusión de MMP-11 catalíticamente inactiva. En realizaciones preferidas, hay un sitio de restricción flanqueando la parte adenovírica del plásmido de forma que el vector adenovírico puede eliminarse fácilmente. El plásmido lanzadera puede replicarse en células procariotas o células eucariotas.

- 5 En una realización de la invención preferida actualmente, se inserta un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una cualquiera de las MMP-11 divulgadas en el presente documento en el plásmido del adenovirus pMRKAdS-HV0 (Véase Emini y cols., documento WO0222080). Este plásmido comprende un genoma adenovírico Ads del que se han eliminado las regiones E1 y E3. El diseño del plásmido pMRKAd5-HV0 se mejoró con respecto a adenovectores anteriores extendiendo la región de empaquetamiento 5' que actúa en cis hacia el interior del gen E1 para incorporar elementos que se descubrió que eran importantes en la optimización del empaquetamiento vírico, resultando en una amplificación del virus potenciada. Ventajosamente, este vector adenovírico potenciado es capaz de mantener la estabilidad genética tras una propagación de pasaje alto.

15 La presente invención proporciona además células huésped recombinantes transformadas o transfectadas con un vector que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento, particularmente células huésped transformadas o transfectadas con un vector que comprende una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico anteriormente mencionadas, en los que la molécula de ácido nucleico está unida de forma operable a un promotor. Las células huésped recombinantes incluyen bacterias tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levaduras, células vegetales, células de mamíferos incluyendo, pero sin limitarse a ellas, líneas celulares de origen bovino, porcino, de mono, humanas o de roedores; y células de insectos incluyendo, pero sin limitarse a ellas, líneas celulares de *Drosophila* y derivadas de gusanos de seda. Por ejemplo, un sistema de expresión de insectos utiliza células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf21) (Invitrogen) en tándem con un vector de expresión de baculovirus (pAcG2T, Pharmingen, San Diego, CA). Asimismo, las especies de mamífero que pueden ser adecuadas y que están comercialmente disponibles, incluyen pero sin limitarse a ellas, células L L-M(TK-)
20 (ATCC CCL-1.3), células L L-M (ATCC CCL-1.2), células Saos-2 (ATCC HTB-85), células 293 (ATCC CRL-1573), células Raji (ATCC CCL-86), células CV-1 (ATCC CCL-70), células COS-1 (ATCC CRL-1650), células COS-7 (ATCC CRL-1651), células CHO-K1 (ATCC CCL-61), células 3T3 (ATCC CCL-92), células NIH/3T3 (ATCC CRL-1658), células HeLa (ATCC CCL-2), células C1271 (ATCC CRL-1616), células BS-C-1 (ATCC CCL-26), células MRC-5 (ATCC CCL-171), células HEK293T (ATCC CRL-1573), células ST2 (Banco de Células Riken, Tokio, Japón RCB0224), células C3H10T1/2 (JCRB0602, JCRB9080, JCRB0003, o IFO50415), y células CPAE (ATCC CCL-209).

- 30 Como se indicó anteriormente un vector de expresión que contiene uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento puede usarse para expresar la MMP-11 recombinante codificada en él en una célula huésped recombinante. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para expresar uno cualquier de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento en una célula huésped recombinante que comprende introducir el vector que comprende un ácido nucleico que codifica la MMP-11 recombinante en una célula huésped adecuada y cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la expresión de uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento. El polinucleótido que codifica la MMP-11 recombinante está unido de forma operable a un promotor heterólogo que puede ser constitutivo o inducible.

40 Tras la expresión de uno cualquiera de los ácidos nucleicos o polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento en una célula huésped, el polipéptido de MMP-11 recombinante puede recuperarse para su uso en una vacuna basada en polipéptido. Los procedimientos para purificar polipéptidos son bien conocidos en la técnica e incluyen la purificación a partir de lisados y extractos celulares mediante diversas combinaciones de, o aplicación individual de fraccionamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción en hidroxapatita, o cromatografía de interacción hidrófoba. Además, se puede separar la MMP-11 recombinante de otros polipéptidos celulares mediante el uso de una columna de inmunoafinidad hecha con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para MMP-11 o el polipéptido elemento inmunopotenciador en el caso del polipéptido de fusión MMP-11.

45 La clonación, los vectores de expresión, transfecciones y transformaciones y el aislamiento de proteínas de proteínas expresadas, son bien conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en Sambrook y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª Edición; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1989) o Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY (2001).

50 Las vacunas de anti-MMP-11 de la presente invención incluyen tanto vacunas de polinucleótido que codifican una cualquiera de las realizaciones de MMP-11 recombinante o polipéptidos de fusión de MMP-11 divulgadas en el presente documento y vacunas de polipéptido que comprenden una cualquiera de las realizaciones de MMP-11 recombinante o polipéptidos de fusión de MMP-11 divulgadas en el presente documento. Los individuos que padecen carcinomas invasivos que sobreexpresan MMP-11, tales como los de mama, colon, cabeza y cuello, pulmón, ovario, páncreas, próstata, piel (carcinoma de células basales), útero (carcinoma de cuello uterino y carcinoma de endometrio) o carcinomas no invasivos que tienen riesgo de evolucionar a invasivos, pueden beneficiarse de la inmunización mediante las vacunas de la presente invención. Las vacunas de anti-MMP-11
60 incluyen además vacunas anti-MMP-11 adenovíricas que comprenden un adenovirus recombinante que tiene uno

cualquier de los polinucleótidos recombinantes divulgados en el presente documento.

En su realización más básica, la vacuna de ácido nucleico o polinucleótido anti-MMP-11 comprende uno cualquiera de los polinucleótidos divulgados en el presente documento, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante o un polinucleótido que codifica una cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas de los polipéptidos recombinantes de MMP-11 o polipéptidos de fusión de MMP-11 bajo el control de o unidos de forma operable a un promotor heterólogo adecuado. El polipéptido de MMP-11 recombinante codificado puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido de MMP-11 de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitarse a ello, la MMP-11 de seres humanos, primates tales como chimpancés, mono Rhesus, mono Cynomolgus; no primates tales como ratón, rata, perro y similares. Preferiblemente, la MMP-11 recombinante codificada tiene la secuencia de aminoácidos de la MMP-11 humana. A continuación se ilustran las realizaciones preferidas actualmente de los ácidos nucleicos que codifican la MMP-11 para su inclusión en los casetes génicos y vectores de expresión anteriormente mencionados para su uso como una vacuna de polinucleótido anti-MMP-11.

En una realización preferida, la MMP-11 codificada por el polinucleótido de la vacuna anti-MMP-11 es catalíticamente inactiva. Por ejemplo, la hMMP-11 catalíticamente inactiva se muestra en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º 4, en la que el codón de nucleótidos GAA que codifica el aminoácido conservado ácido glutámico en la posición 216 de la hMMP-11 se había cambiado por el codón de nucleótidos GTG que codifica el aminoácido valina para producir una hMMP-11 catalíticamente inactiva que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 5. Al mismo tiempo que se cambió el codón de nucleótidos que codifica el residuo de ácido glutámico por un codón de nucleótidos que codifica valina, el codón de nucleótidos también puede cambiarse para otros aminoácidos o cambiarse los residuos de histidina por otros aminoácidos sin alejarse de la invención.

Como se describe anteriormente, se ha demostrado que la optimización de los codones de los genes o unidades de transcripción que codifican para polipéptidos concretos da lugar a un aumento de la expresión del polipéptido codificado, es decir, a un aumento de la traducción del ARNm que codifica el polipéptido. En el caso de una vacuna de polinucleótido, el aumento de la expresión del polipéptido codificado produce más polipéptido codificado, lo que puede dar lugar a un aumento de la inmunogenicidad de la vacuna *in vivo*, que a su vez, puede potenciar la eficacia de la vacuna. Por lo tanto, en realizaciones adicionales, los codones de nucleótidos que codifican los aminoácidos que comprenden la MMP-11 se optimizan para potenciar la expresión de la MMP-11 y, así, la eficacia de la vacuna anti-MMP-11. Esto es, uno o más de los codones de nucleótidos que codifican la MMP-11 que aparece con una frecuencia baja en ácidos nucleicos que codifican proteínas altamente expresadas en seres humanos, han sido reemplazados con codones de nucleótidos que aparecen con una frecuencia mayor en los ácidos nucleicos que codifican las proteínas altamente expresadas en seres humanos. La secuencia de nucleótidos de la hMMP-11 que es catalíticamente inactiva y en la que los codones que codifican la hMMP-11 catalíticamente inactiva se han sometido a optimización de codones se muestra en la SEC ID N.º 6.

El modelo de ratón de los ejemplos muestra que la eficacia de una vacuna anti-MMP-11 que comprende un polinucleótido que codifica una MMP-11 de ratón con codones optimizados, catalíticamente inactiva, se potenciaba cuando el codón carboxiterminal de los codones que codifican la mMMP-11-opt estaba unida a codones que codifican el polipéptido del elemento inmunopotenciador: la LTB de *E. coli*. Por lo tanto el polinucleótido comprende un ácido nucleico que codifica la MMP-11 catalíticamente inactiva unida a un polinucleótido que codifica un polipéptido elemento inmunopotenciador (polipéptido de fusión de MMP-11). El polinucleótido comprende un ácido nucleico que codifica la MMP-11 catalíticamente inactiva unida a un polinucleótido que codifica la LTB de *E. coli* de forma que el polinucleótido codifica una proteína de fusión de MMP-11 - LTB. El polinucleótido que codifica la LTB no incluye los codones que codifican el péptido señal de la LTB. La MMP-11 es hMMP-11. La secuencia de nucleótidos de la LTB de *E. coli* sin el péptido señal se muestra en la SEC ID N.º 7 y su secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º 9. La secuencia de polinucleótidos que codifica la LTB de *E. coli* sin el péptido señal en la que los codones de nucleótidos se han optimizado para la expresión potenciada en seres humanos se muestra en la SEC ID N.º 8. En una realización particularmente preferida, los codones de nucleótidos que comprenden el polinucleótidos que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva la LTB se optimizan para potenciar la expresión en seres humanos.

Por lo tanto, a la luz de lo anterior, la presente invención proporciona además una vacuna de ácido nucleico o polinucleótido que codifica un sólo polipéptido de fusión que comprende una MMP-11 catalíticamente inactiva unida a una LTB de *E. coli* con la secuencia señal trunca. Un ejemplo de una vacuna de ese tipo comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 5 (hMMP-11 catalíticamente inactiva) y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 8 (LTB) o la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º 4 (hMMP-11 catalíticamente inactiva) y la SEC ID N.º 7 (codifica LTB sin péptido señal) o la SEC ID N.º 8 (en la que los codones de nucleótidos que codifican la LTB sin péptido señal se han optimizado para su expresión en seres humanos), respectivamente. Como ejemplo, la vacuna comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión hMMP-11-LTB catalíticamente inactivo que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 10. Un polipéptido de ese tipo puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N.º 11.

En una realización preferida de la vacuna de polinucleótido anti-MMP-11, los codones de nucleótidos del polinucleótido que codifica la MMP-11 catalíticamente inactiva se optimizan para su expresión potenciada en seres

humanos como se describe anteriormente. Es más preferible que los codones de nucleótidos del polinucleótido que codifica el elemento inmunopotenciador también están potenciados para su expresión potenciada en seres humanos. Un ejemplo de un polinucleótido de ese tipo comprendería la secuencia de polinucleótidos con codones optimizados de la SEC ID N.º: 6 que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva y la secuencia de nucleótidos con codones optimizados de la SEC ID N.º: 8 que codifica la LTB. Como ejemplo, el polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión de hMMP-11-LTB catalíticamente inactivo, con codones optimizados tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N.º: 12.

Las vacunas de polinucleótido anti-MMP-11 pueden administrarse mediante diversidad de mecanismos de administración tales como inyección directa, electroporación, administración a través de mucosas, y similares. En algunas realizaciones preferidas, la vacuna se administra por vía intramuscular, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, por bombardeo con pistola génica, por vía tópica u oralmente. Por ejemplo, la vacuna puede administrarse intramuscularmente en el músculo deltoides y puede administrarse usando una jeringa de 0,5 ml seguida por un estímulo eléctrico en los dos minutos posteriores a la inyección. El estímulo eléctrico puede proporcionarse usando el sistema de suministro MEDPULSER DNA (Inovio Biomedical Corporation, San Diego, CA). Preferiblemente, la vacuna de polinucleótido anti-MMP-11 comprende uno cualquiera de los polinucleótidos anteriores en vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares, y sus combinaciones. En una realización preferida actualmente, la vacuna está formulada en una solución salina. En algunos casos se prevé que las vacunas de polinucleótido puedan comprender el vector de expresión de una bacteria, como una cepa atenuada de *Shigella flexneri*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, o *Listeria monocytogenes*. Las vacunas de polinucleótido anti-MMP-11 también pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, tampones y similares.

La vacuna de polinucleótido anti-MMP-11 puede incluir uno o más adyuvantes genéticos (ácidos nucleicos que codifican uno o más adyuvantes moleculares) capaces de modular la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1 o Th2. Tales adyuvantes genéticos incluyen, pero sin limitarse a ellos, moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86; citocinas proinflamatorias tales como interleucina-1 α (IL-1 α); factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y TNF- β); citocinas de Th1 tales como IL-2, IL-12, IL-15, e IL-18; citocinas de Th2 tales como IL-4, IL-5, e IL-10; factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF); IL-8; proteína 10 inducible por interferón- γ (iIP-10); proteína 1 α inhibidora de macrófagos (MIP-1 α); y RANTES. Sasaki y cols., Methods 31: 243-254 (2003), proporciona una buena descripción sobre formulaciones de adyuvante y sistemas de administración para vacunas de ADN (véase también Kim y cols., J. Interferon Cytokine Res. 20: 487-498 (2000) y Kim y cols., Human Gene Therapy 11: 305-321 (2000)). Los adyuvantes genéticos pueden proporcionarse en un casete de expresión en un vector de expresión separado del vector de expresión que codifica la hMMP-10 en una cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas o en el mismo vector de expresión que codifica la hMMP-11 en una cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas.

La vacuna de polinucleótido anti-MMP-11 puede incluir uno o más adyuvantes convencionales. Los adyuvantes convencionales incluyen, pero sin limitarse a ellos, sales mineral tales como fosfato o hidróxido de aluminio, adyuvantes derivados de bacterias tales como monofosforil lípido A, toxina colérica, muramil péptidos, partículas lipídicas tales como liposomas catiónicos y liposomas recubiertos con manano, adyuvantes emulsionantes tales como QS-21, y adyuvantes sintéticos tales como ubenimex. Pueden encontrarse adyuvantes y excipientes adicionales en "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2ª Edición)" de Vogel y cols., Vaccine and Prevention Research Program, Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

Las vacunas de polinucleótido anti-MMP-11 de la presente invención se administran preferiblemente como una disolución o suspensión en un vehículo farmacéuticamente aceptable, con una concentración de ADN en el intervalo de aproximadamente 10 μ g/ml a aproximadamente 5 mg/ml. En general, se administra una dosis inmunológicamente o profilácticamente efectiva de aproximadamente 5 mg, y preferiblemente aproximadamente 0,05, de un vector de vacuna plasmídico directamente en tejido muscular. La dosis apropiada dependerá del individuo que se va a vacunar, y puede depender de la capacidad del individuo para expresar los ácidos nucleicos que codifican la hMMP-11 contenida en la vacuna y del sistema inmunitario del individuo para reaccionar frente a la hMMP-11 expresada. La dosis exacta elegida también puede depender, en parte, del juicio del facultativo médico que administre o solicite la administración de la vacuna.

Las vacunas anti-MMP-11 incluyen además adenovirus recombinantes que comprenden uno cualquiera de los polinucleótidos recombinantes anteriormente mencionados. Actualmente, la vacuna de adenovirus se administra preferiblemente por vía intramuscular en el deltoides diluida en un diluyente tal como solución salina tamponada con fosfato en un volumen final de menos de aproximadamente 1 ml. Una dosis eficaz del adenovirus recombinante es generalmente de 10⁶ a 10¹² partículas víricas, preferiblemente de aproximadamente 10⁷ a 10¹¹ partículas víricas.

En algunas realizaciones de esta invención, las vacunas de adenovirus y polinucleótido anti-MMP-11 divulgadas en el presente documento se usan en diversas combinaciones de sensibilización/refuerzo para inducir una respuesta inmunitaria potenciada. En este caso, los dos vectores se administran en un régimen de "sensibilización y refuerzo". Por ejemplo, el primer tipo de vector se administra una o más veces, después, tras una cantidad de tiempo

predeterminada, por ejemplo, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, seis meses, u otro intervalo apropiado, se administra un segundo tipo de vector una o más veces. Preferiblemente los vectores portan casetes de expresión que codifican el mismo polinucleótido o combinación de polinucleótidos. En la realización en la que también se usa un vector plasmídico, se prefiere que el vector contenga uno o más promotores reconocidos por células de mamíferos o insectos. En una realización preferida, el vector plasmídico contendría un promotor fuerte, tal como, pero sin limitarse a él, el promotor de CMV.

Como se ha indicado anteriormente, una vacuna de vector adenovirico anti-MMP-11 y una vacuna de polinucleótido anti-MMP-11 pueden administrarse a un vertebrado como parte de un sólo régimen terapéutico para inducir una respuesta inmunitaria. En una realización, el primer vector es un plásmido y el segundo vector es un vector de adenovirus. En una realización alternativa, el primer vector es un vector de adenovirus y el segundo vector es un plásmido. En el procedimiento descrito anteriormente, el primer tipo de vector puede administrarse más de una vez, estando cada administración del vector separada por una cantidad de tiempo predeterminada. Dicha serie de administración del primer tipo de vector puede estar seguida de la administración de un segundo tipo de vector una o más veces, después de que haya pasado una cantidad de tiempo determinada. Como en el tratamiento con el primer tipo de vector, el segundo tipo de vector también puede administrarse una vez o más de una, después de intervalos de tiempo predeterminados.

Otra realización de la presente invención es un kit que comprende las vacunas de adenovirus o polinucleótidos anti-MMP-11 de la presente invención empaquetadas en contenedores adecuadamente esterilizados tales como ampollas, botellas, viales y similares, en formas multidosis o como dosis unitarias. Preferiblemente, los contenedores se sellan herméticamente después de haber sido llenados con una preparación de vacuna. Preferiblemente, las vacunas de polinucleótido anti-MMP-11 están empaquetadas en un contenedor que tiene una etiqueta pegada, etiqueta que identifica la vacuna y contiene un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora tal como la Food and Drug Administration de Estados Unidos que refleja la aprobación de vacuna de acuerdo con las leyes pertinentes, información sobre la dosificación, y similares. La etiqueta preferiblemente contiene información acerca de la vacuna que es útil para un profesional sanitario que administre la vacuna a un paciente. Asimismo, el kit preferiblemente contiene material informativo impreso relativo a la administración de la vacuna, instrucciones, indicaciones y cualquier advertencia necesaria.

En su forma de realización más básica, las vacunas de polipéptido anti-MMP-11 de la presente invención comprenden una MMP-11 catalíticamente inactiva, en las que el uno o más de los aminoácidos conservados que comprenden el sitio de unión a zinc H E X X H X X G X X H (SEC ID N.º: 3) de la MMP-11 se cambian por un aminoácido alternativo. Por ejemplo, como se muestra en la SEC ID N.º: 5, en la que el ácido glutámico conservado en la posición 216 de la hMMP-11 se cambió por el aminoácido valina para producir una MMP-11 catalíticamente inactiva. La MMP-11 catalíticamente inactiva es un polipéptido de fusión de MMP-11 en el que la MMP-11 está unida en su extremo carboxi a un polipéptido elemento inmunopotenciador o una parte sustancial del mismo. El polipéptido elemento inmunopotenciador el el polipéptido LTB en el que se ha eliminado el péptido señal, por ejemplo, la hMMP-11 catalíticamente inactiva que se muestra en la SEC ID N.º: 5 unida al polipéptido LTB que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 7.

Las vacunas de polinucleótido anti-MMP-11 pueden administrarse mediante diversidad de mecanismos de administración tales como inyección directa, administración a través de mucosas, administración oral, y similares. En algunas realizaciones preferidas, la vacuna se administra por vía intramuscular, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, tópica u oral. Preferiblemente, las vacunas de polinucleótido anti-MMP-11 están formuladas con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares, y sus combinaciones. Las vacunas de polinucleótido anti-MMP-11 también pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, tampones y similares. La vacuna de polipéptido anti-MMP-11 puede incluir uno o más adyuvantes capaces de modular la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1 o Th2. Tales adyuvantes moleculares incluyen, pero sin limitarse a ellos, moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86; citocinas proinflamatorias tales como interleucina-1 α (IL-1 α); factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y TNF- β); citocinas de Th1 tales como IL-2, IL-12, IL-15, e IL-18; citocinas de Th2 tales como IL-4, IL-5, e IL-10; factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF); factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). IL-8; proteína 10 inducible por interferón- γ (γ IP-10); proteína 1 α inhibidora de macrófagos (MIP-1 α); y RANTES. La vacuna de polipéptido anti-MMP-11 puede incluir uno o más adyuvantes convencionales. Los adyuvantes convencionales incluyen, pero sin limitarse a ellos, sales mineral tales como fosfato o hidróxido de aluminio, adyuvantes derivados de bacterias tales como monofosforil lípido A, toxina colérica, muramil péptidos, partículas lipídicas tales como liposomas catiónicos y liposomas recubiertos con manano, adyuvantes emulsionantes tales como QS-21, y adyuvantes sintéticos tales como ubenimex. Pueden encontrarse adyuvantes y excipientes adicionales en el anteriormente mencionado "A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2ª Edición)" de Vogel y cols.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente las características y realizaciones de la presente invención, y no tienen la intención de ser limitantes.

Ejemplo 1

Para construir un vector que exprese la MMP-11 de ratón se clonó ADNc de fibroblastos de ratón, que eran parte del compartimento estromal. Se extrajo el ARN total de células NIH-3T3 y se usaron oligonucleótidos específicos para la MMP-11 de ratón para amplificar el ADNc usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores de PCR usados fueron el 5'-MMP-11 directo, con la secuencia de nucleótidos 5'-CCCGGGGCGG ATGGCACGGG CCGCCTGTC-3' (SEC ID N.º: 16) y el oligonucleótido degenerado inverso 3'-MMP-11-1473 con la secuencia de nucleótidos 5'-GTCAGMG-GAA AGTRTTGGCA GGCTCAGCAC AG-3' (SEC ID N.º: 17) en los que M es A o C y R es A o G. La reacción de RT-PCR se realizó como sigue: 45°C durante 30 minutos; 94°C durante 2 minutos, y posteriormente 40 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 58°C durante 30 segundos, y 68°C durante 2 minutos.

Se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 1630 pb y se clonó en el vector de clonación TA pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para producir el plásmido pCR2.1-MMP-11. El análisis de la secuencia de ADN del producto de amplificación mostró que la secuencia de ADN del producto de amplificación clonado coincidía totalmente con la secuencia de nucleótidos del ADNc de la MMP-11 de ratón (número de acceso: NM-008606). El ADN que codifica la MMP-11 se eliminó del pCR2.1-MMP-11 digiriéndolo con EcoRI y clonándolo en el sitio EcoRI del plásmido vector pV1JnsB para producir el vector de expresión pV1JnsB-MMP-11 (Figura 1). Como se muestra en la Figura 1, el ADNc que codifica la MMP-11 está aguas abajo de un promotor de CMV humano. Los vectores pV1JnsB han sido descritos por Montgomery y cols. en *DNA Cell Biol.* 12:777-783 (1993).

Para verificar la expresión de la MMP-11, se transfectaron células HeLa con pV1JnsB-MMP-11. Se analizaron extractos celulares por transferencia western usando un anticuerpo para MMP-11 humana en reacción cruzada con MMP-11 de ratón. Como se muestra en la Figura 2, se detectó una banda de aproximadamente 50 kDa, que indicaba que la MMP-11 era expresada por el vector.

Ejemplo 2

Se ha demostrado que la optimización de los codones de los genes que codifican distintos tipos de antígenos puede conducir a una expresión aumentada y una inmunogenicidad potenciada *in vivo*. Por lo tanto, para aumentar la expresión y potenciar la inmunogenicidad de la mMMP-11, se optimizaron los codones de la secuencia codificante de la mMMP-11.

La secuencia de ADNc de la mMMP-11 se convirtió en una secuencia de polinucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos pero con el uso de codones optimizados para su expresión en células de ratón (para una descripción general de la optimización de codones, véase Lathe, *J. Molec. Biol.*: 183: 1-12 (1985)). La metodología consistió, en general, en identificar codones en la secuencia de polinucleótidos de la mMMP-11 de tipo salvaje que no se asocian normalmente con genes altamente expresados en ratones y reemplazarlos con codones que se asocian habitualmente con genes altamente expresados en ratones para producir un polinucleótido que tenga sólo codones asociados habitualmente con genes altamente expresados para una expresión alta del polinucleótido en células originarias de ratón. La secuencia génica nueva se analizó entonces para buscar secuencias no deseadas generadas por estos reemplazos de codones (por ejemplo, secuencias "ATTTA", creación accidental de sitios de reconocimiento de ayuste de intrones, sitios de restricción enzimáticos no deseados, contenido alto en GC, etc.). Las secuencias no deseadas se eliminaron mediante sustitución de los codones que comprendían las secuencias no deseadas con otros codones, preferiblemente, si es factible, con otro codón asociado con genes altamente expresados que codifique para el mismo aminoácido. Después, se analiza si ha mejorado la expresión de los segmentos génicos sintéticos. El gen con codones optimizados para la expresión en ratones se diseñó usando el algoritmo del programa Vector NTI (InforMax, Rockville, MD). Para incrementar el nivel de transcripción, se insertó una secuencia de Kozak optimizada en 5' del codón de iniciación ATG. Además, se insertaron dos codones de terminación consecutivos aguas abajo de la secuencia codificante para potenciar la terminación de la traducción.

El ADNc con codones optimizados que codifica la mMMP-11 se sintetizó por ensamblaje de oligonucleótidos realizado en GENEART GmbH, Alemania, y después se clonó en el sitio *BglIII/Sall* del vector pV1JnsA, generando así el pV1JnsA-mMMP-11opt. Con el fin de anular la actividad enzimática de la MMP-11 sin modificar sus propiedades inmunogénicas, se introdujo una mutación puntual en el sitio catalítico, que cambió el ácido glutámico (E) de la posición 220 por una alanina (A) (Noel y cols., *Oncogene*. 19: 1605-12 (2000)). Esto produjo el vector pV1JnsA-mMMP-11(cat-)opt. La secuencia de nucleótidos de la variante de mMMP-11 catalíticamente inactiva, con codones optimizados, (mMMP-11(cat-)opt), se muestra en la Figura 3 (SEC ID N.º: 13) y el mapa del vector pV1JnsA-mMMP-11(cat-)opt se muestra en la Figura 6A.

El documento WO2005077977 mostró que una fusión genética del antígeno carcinoembrionario (CEA) con elementos inmunopotenciadores tales como la toxina termolábil B (LTB) de *E. coli* aumentaba adicionalmente la eficacia de la vacunación contra CEA. Por lo tanto, para potenciar la eficacia de la MMP-11, se sintetizó el polinucleótido con codones optimizados que codifica la mMMP-11 catalíticamente inactiva unida a la LTB de *E. coli* con la secuencia señal eliminada y se clonó en el sitio *BglIII/Sall* del vector pV1JnsA, generando así el pV1JnsA-mMMP-11(cat-)LTBopt (Figura 6B). La mMMP-11-LTB catalíticamente inactiva de fusión se sintetizó por ensamblaje de oligonucleótidos realizado en GENEART GmbH, Alemania. Los codones que codifican la LTB se optimizaron para su expresión en células de origen humano. La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos con codones

optimizados que codifica el polipéptido de fusión de mMMP-11-LTB catalíticamente inactivo y la Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión de mMMP-11-LTB catalíticamente inactivo, respectivamente.

Para probar la expresión de pV 1 JnsA-mMMP-11 (cat-)-LTBopt, se transfectaron células HeLa con pV1jnsA-mMMP-11 (cat-)-LTBopt mediante Lipofectamine2000 (Invitrogen). Se prepararon extractos de células enteras usando tampón de lisis (SDS al 2%, EGTA 5 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) y se analizaron por transferencia western para comprobar la expresión de la proteína de fusión mMMP-11-LTB catalíticamente inactiva. La proteína de fusión mMMP-11-LTB catalíticamente inactiva se detectó usando anticuerpos anti-MMP-11 y anti-LTB siguiendo protocolos estándar de transferencia Western. Los anticuerpos anti-MMP-11 y -LTB eran de BIOMOL (Exter, Reino Unido y Plymouth Meeting, PA, Anti-MMP-11 cat. N.º SA-371) y Abcam (Cambridge, Reino Unido y MA, Anti-toxina termolábil de *E. Coli*, cat N.º ab9199). Como se indica en la Figura 7, ambos anticuerpos se unieron a una banda de aproximadamente 60 KDa, que correspondía al peso molecular de la proteína de fusión mMMP-11-LTB catalíticamente inactiva.

Ejemplo 3

Para probar el potencial inmunogénico de mMMP-11(cat-)-opt y mMMP-11(cat-)-LTBopt en comparación con la mMMP-11 de tipo salvaje, se inmunizaron ratones BALB/c por vía intramuscular con cuatro inyecciones de ADN 50 µg de ADN plasmídico en solución salina seguidas de electroporación (EP) 1 semana después, de acuerdo con Zucchelli y cols. (Enhancing B and T cell Immune response to an HCV E2 DNA vaccine by muscle electro gene transfer. *J. Virol.* 74: 11598-11607, (2000)). Dos semanas después de la última inyección, se sacrificaron los ratones y se midió la respuesta inmunitaria contra péptidos mMMP-11 mediante tinción intracelular para interferón gamma (IFN γ). Como se muestra en la Figura 8, tanto la de tipo salvaje como la mMMP-11 opt catalíticamente inactiva fueron eficaces en la ruptura de la tolerancia en ratones (% CD8+IFN γ +>0,1%). No parece que hubiera ninguna diferencia significativa entre la mMMP-11 y la mMMP-11opt catalíticamente inactiva. No obstante, como se muestra también en la Figura 8 la fusión de la mMMP-11 opt catalíticamente inactiva a LTB incrementó significativamente la respuesta inmunitaria (p<0,05).

La respuesta humoral se midió en una transferencia western. Para medir la respuesta inmunitaria humoral, se separaron extractos de células enteras de células HeLa transfectadas con pV 1 JnsB-MMP-11 en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los sueros de los ratones inmunizados anteriormente se incubaron con las membranas. Después, la detección de anticuerpos de ratón contra mMMP-11 fue usando una anti-IgG de ratón conjugada con fosfatasas alcalinas (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). La detección de una banda correspondiente al peso molecular de la mMMP-11 indica la presencia de anticuerpos contra mMMP-11. Como se muestra en la Figura 9, no se observaron diferencias claras significativas en la respuesta humoral entre ratones inmunizados con mMMP-11 y ratones inmunizados con mMMP-11(cat-)-LTBopt catalíticamente inactiva.

Basándose en los resultados mostrados en la Figura 8, se seleccionó mMMP-11 (cat-)-LTBopt como el mejor inmunógeno para usar en los estudios de vacunación.

Ejemplo 4

Se produjo un modelo de tumor que sobreexpresa MMP-11 como sigue. La 1,2-dimetilhidrazina (DMH) o su metabolito azoximetano se usan frecuentemente como el carcinógeno iniciador en estudios de inducción de tumores. Se ha encontrado que la DMH induce tumores colónicos en numerosas especies de animales (Choudhary and H. Hansen, *Chemosphere* 37: 801-843 (1998)), incluso después de una única exposición oral en algunos casos, pero normalmente se usan de 6 a 10 tratamientos semanales. La DMH es un agente alquilante y se ha demostrado que el tratamiento con este compuesto químico induce aductos metílicos en bases de ADN, mutaciones puntuales, micronúcleos e intercambios de cromátidas hermanas. El tratamiento con DMH induce la apoptosis en el colon (Blakey y cols., *Cancer Res.* 45: 242-249 (1985)) así como un aumento en la proliferación celular de células epiteliales del colon (Ma y cols., *World J. Gastroenterol.* 8: 847-852 (2002)), que es una característica del cáncer de colon humano.

En cepas de ratones susceptibles, tales como A/J, pero también en menor medida en BALB/c, la progresión de la carcinogénesis inducida por DMH en tejido de colon pasa por diferentes etapas: (1) formación de criptas aberrantes (ACF); (2) Adenoma; (3) Pólipo; y (4) Adenocarcinoma. Con el fin de verificar la expresión de mMMP-11 en este proceso de tumorigénesis, los ratones A/J recibieron seis inyecciones semanales de DMH y se sacrificaron cinco semanas después de la última inyección de DMH: en esta etapa tanto las criptas aberrantes como algunos adenomas estaban presentes en el tejido de colon de ratón. Se congeló tejido de intestino y se analizó por transferencia western e inmunohistoquímica (IHC) usando un anticuerpo contra mMMP-11. En ratones no tratados (vehículo), el análisis de IHC mostró expresión de mMMP-11 en la base de criptas normales: parece que la expresión de mMMP-11 se limitó a células madre colónicas. Se detectó expresión fuerte y difundida en criptas aberrantes y formaciones de adenoma (Figura 10). Esta observación se confirmó por análisis de transferencia western de extractos tisulares de colon de ratones tratados con DMH o dejado sin tratar: la forma activada de mMMP-11 estaba presente en colon tratado con DMH (Figura 10), indicando así la sobreexpresión de la proteinasa por el tejido tumoral. Estos datos indican la idoneidad de la carcinogénesis inducida por DMH como modelo para el tratamiento y vacunación anti-MMP-11.

Ejemplo 5

Este ejemplo muestra la eficacia terapéutica de la vacuna anti-MMP-11. Como se indica en el ejemplo anterior, la MMP-11 se sobreexpresa en formaciones de criptas aberrantes (ACF) y adenomas inducidos por la administración de 1-2dimetilhidrazina (DMH) en ratones A/J. Otros estudios han demostrado que la DMH no interfiere con el sistema inmunitario y la eficacia de la vacunación genética. El siguiente experimento se realizó para determinar si la DMH interferiría con la funcionalidad del sistema inmunitario y la eficacia de la vacunación genética.

Se trataron grupos de 10 ratones BALB/c o A/J con seis inyecciones intraperitoneales (IP) de DMH empezando a partir de la quinta semana de edad o se dejaron sin tratar (Mock). En las semanas ocho y 11, todos los ratones recibieron inyecciones de 50 µg del plásmido pV1J-CEAopt (Véase el documento WO2005077977 para pV1J-CEAopt). Dos semanas después, los ratones se sangraron y sus respuestas inmunitarias al CEA codificado por pV1J-CEAopt se analizaron por tinción intracelular tras estimulación con péptidos de 15 unidades que abarcan la proteína CEA. Para los ratones BALB/c, se midió la respuesta inmunitaria CD8+. La Figura 19A muestra que no hubo diferencias significativas en la respuesta CD8+ entre ratones BALB/c tratados con DMH y tratados con mock. Para los A/J ratones, se midieron las respuestas inmunitarias CD8+ y CD4+. Las Figuras 19B y 19C muestran que no hubo diferencias significativas en las respuestas CD8+ y CD4+ entre ratones A/J tratados con DMH y tratados con mock. Estos resultados demostraron que la DMH no parecía influir en la actividad del sistema inmunitario. En conjunto, estos datos sugieren que la MMP-11 es un antígeno asociado a tumores y que una vacuna contra MMP-11 sería un medio viable para tratar cánceres que sobreexpresan MMP-11.

Para probar la eficacia de una vacuna anti-MMP-11, se trataron grupos de 60 ratones A/J con DMH con seis inyecciones semanales: un grupo se deja sin tratar (naive), un segundo grupo se inmuniza con pV1jnsA-mMMP-11(cat)-LTBopt seguido de electroporación, como se indica en el esquema mostrado en la Figura 11A. Dos semanas después de la última inmunización, se analizó la inmunidad mediada por células (CMI) frente a mMMP-11 con un conjunto de péptidos de 15 unidades que abarca la proteína completa; sin embargo, se detectó una respuesta inmunitaria pobre en los grupos analizados (datos no mostrados). De siete a ocho semanas después de la última inyección, se sacrificaron 20 ratones por grupo y se analizó la presencia de ACF, adenomas, pólipos y adenocarcinomas en el colon. Los ratones vacunados muestran una reducción significativa de la presencia de ACF, adenomas, pólipos y adenocarcinomas inducida por DMH (Figuras 11B a 11E).

Ejemplo 6

Para confirmar la eficacia de la protección contra tumores en el modelo de carcinogénesis con DMH en otra cepa de ratón cepa, se siguió el mismo esquema de tratamiento e inmunización que anteriormente, usando ratones BALB/c. Dos semanas después de la última inmunización, se analizó la CMI contra mMMP-11, con un conjunto de péptidos de 15 unidades que abarca la proteína entera.

Para la preparación de esplenocitos a partir de ratones inmunizados, se extrajeron los bazo de ratones sacrificados de forma estéril y se rompieron pasándolos a través de una rejilla. Se obtuvo la lisis de eritrocitos mediante incubación durante 10 minutos con tampón de lisis ACK (Life Technologies, Bethesda, MD). Después de la centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron las células blancas en medio R10. Aproximadamente de 1 a 2 x 10⁶ esplenocitos o PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se resuspendieron en 1 ml de medio R10. Se añadieron péptidos antigénicos a una concentración final de 1 µg/ml con Brefeldina A. Los péptidos antigénicos de mMMP-11 comprendían un conjunto de péptidos de 15 unidades, que juntos abarcaban el péptido MMP-11 entero. El número total de péptidos fue de 121 y se dividió en 4 conjuntos (A, de 1 a 30; B, de 31 a 60; C, de 61 a 90; D, de 91 a 121).

Después de 12 horas de incubación a 37°C, se lavaron las células con 3 ml de tampón FACS (PBS suplementado con FBS al 1 % y que contiene NaN₃ al 0,05%) y se centrifugaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron con anti-CD16/CD32 de ratón en 100 µL de tampón FACS durante 15 minutos a 4°C. Entonces, después de lavar las células con tampón FACS, se analizó la secreción de IFNγ de las células tras incubación con péptidos antigénicos de mMMP-11 de 15 unidades. Para la tinción de antígenos de superficie se añadieron anti-CDD3□ de ratón conjugado con aloficocianina (APC), anti-CD4 de ratón conjugado con ficoeritrina (PE), y anti-CD8α de ratón conjugado con proteínas peridinin clorofila (PerCP), todos diluidos 1:50 en tampón FACS, a las células en un volumen final de 100 µL y se incubaron las células durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de lavar con PERMWASH (Pharmingen), las células se resuspendieron en 100 µL de solución CYTOFIX-CYTOPERM (Pharmingen), se agitaron en un vórtex y se incubaron durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

Para la tinción intracelular, se incubaron las células con anti-interferón γ de ratón conjugado con fluoresceína (FITC) diluido 1:50 en PermWash (volumen final de 100 µL) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de lavar, las células se resuspendieron en de 250 a 300 µl de formaldehído al 1% en PBS y se analizaron con un FACS CALIBER (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Se detectó una respuesta inmunitaria significativa en los grupos inmunizados principalmente dirigida contra el extremo C de la proteína y era específica para CD8+ (Figura 12A). Los efectores CD8+ desencadenados eran funcionales, puesto que fueron capaces de lisar células tumorales diana cargadas con péptidos antigénicos de

mMMP-11 (Figura 12B). Lo más importante, se observó una protección significativamente alta en ratones vacunados en todas las etapas desde ACF a adenomas (Figuras 13A a 13D). Estos datos indican que la MMP-11 es una diana óptima para inmunoterapia específica activa y que la vacunación es extremadamente eficiente en la protección contra tumores.

5 Ejemplo 7

Clonación y optimización de secuencia de nucleótidos que codifica la MMP-11 humana catalíticamente inactiva.

Análogamente a la MMP-11 de ratón, se optimizaron los codones de la MMP-11 humana de acuerdo con el uso de codones más frecuentes en células humanas y se hizo catalíticamente inactiva cambiando el codón para el ácido glutámico (E) del sitio catalítico de la posición 220 por una alanina (A). El polinucleótido que comprende la hMMP-11 catalíticamente inactiva, con codones optimizados, se sintetizó por ensamblaje de oligonucleótidos (GENEART, GmbH) y se clonó en el sitio *BglIII/EcoRI* del vector pV1JnsA, generando pV1JnsA-hMMP-11(cat-)opt (Figura 18). La secuencia de nucleótidos del polinucleótido con codones optimizados que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva se muestra en la Figura 14. La secuencia de aminoácidos de la hMMP-11 catalíticamente inactiva se muestra en la Figura 15. El vector pV1JnsA-hMMP-11 (cat-)opt se diseñó para su uso en seres humanos y puede usarse en modelos preclínicos tales como ratones transgénicos para MHC de clase I humanas, tales como HLA-A2.1 para identificar epítomos inmunogénicos.

Para mejorar la eficacia de la vacuna anti-MMP-11 que comprende la hMMP-11, se sintetizó el polinucleótido con codones optimizados que codifica la hMMP-11 catalíticamente inactiva unida a la LTB de *E. coli* con la secuencia señal eliminada y se clonó en el sitio *BglIII/SalI* del vector pV1JnsA, generando así el pV1JnsA-MMP-11(cat-)-LTBopt (Figura 20). La secuencia de nucleótidos de pV1JnsA-MMP-11 (cat-)-LTBopt se muestra en la SEC ID N.º: 18. La secuencia de nucleótidos comienza en el segundo nucleótido del polienlazador *XbaI* separando los codones de nucleótidos que codifican la hMMP-11 catalíticamente inactiva de los codones de nucleótidos que codifican la LTB. En la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º 18, promotor de CMV incluye los nucleótidos 3647 a 4261, el intrón A incluye los nucleótidos 4396 a 5221, la hMMP-11 catalíticamente inactiva incluye los nucleótidos 5253 a 6715, el polienlazador *XbaI* incluye los nucleótidos 6715 a 5, la LTB incluye los nucleótidos 6 a 315 y la poliA de BGH incluye los nucleótidos 382 a 599. El polinucleótido que codifica la MMP-11-LTB humana catalíticamente inactiva de fusión puede sintetizarse mediante ensamblaje de oligonucleótidos, que puede realizarse en GENEART GmbH, Alemania.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merck & Co., Inc.
Auriscchio, Luigi
5 Peruzzi, Daniela
La Monica, Nicola
Ciliberto, Gennaro
Lazzaro, Domenico
10 Mori, Federica

<120> VACUNA DE METALOPROTEINASA 11 DE LA MATRIZ

<130> PCT ITR0108

15 <150> 60/724,498
<151> 2005-10-07

<160> 18

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 1467
<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (0)...(0)

30 <223> ADNc que codifica MMP-11 humana

<400> 1

```
atggctccgg ccgcctggct ccgcagcgcg gccgcgcgcg ccctcctgcc cccgatgctg 60
ctgctgctgc tccagecgc cccgctgctg gcccgggctc tgccgccgga cgcccaccac 120
ctccatgccg agaggagggg gccacagccc tggcatgcag ccctgcccag tagcccggca 180
```

ES 2 370 040 T3

```

cctgcccctg ccacgcagga agccccccgg cctgccagca gcctcaggcc tccccctgt 240
ggcgtgcccc acccatctga tgggctgagt gcccgcgaacc gacagaagag gttcgtgett 300
tctggcgggc gctgggagaa gacggacctc acctacagga tccttcgggtt cccatggcag 360
ttggtgcagg agcagggtgcg gcagacgatg gcagaggccc taaaggatg gagcgatgtg 420
acgccactca cctttactga ggtgcacgag ggccgtgctg acatcatgat cgacttcgcc 480
aggtactggc atggggacga cctgccgttt gatgggcctg ggggcatcct ggcccatgcc 540
ttcttcccc aagactcaccg agaaggggat gtccacttcg actatgatga gacctggact 600
atcggggatg accagggcac agacctgctg cagggtggcag cccatgaatt tggccacgtg 660
ctggggctgc agcacacaac agcagccaag gccctgatgt ccgccttcta cacctttcgc 720
taccactga gtctcagccc agatgactgc aggggcgttc aacacctata tggccagccc 780
tggcccactg tcacctccag gaccccagcc ctggggcccc aggetgggat agacaccaat 840
gagattgcac cgctggagcc agaegccccg ccagatgcct gtgaggcctc ctttgacgcg 900
gtctccacca tccgaggcga gctcttttc tcaaaagcgg gctttgtgtg ggcctccgt 960
gggggccagc tgcagcccgg ctaccagca ttggcctctc gccactggca gggactgcc 1020
agccctgtgg acgctgcctt cgaggatgcc cagggccaca tttggttctt ccaagggtgt 1080
cagtactggg tgtacgacgg tgaagccca gtcctgggcc cgcaccctt caccgagctg 1140
ggcctggtga ggttcccggc ccatgctgcc ttggtctggg gtcccagaaa gaacaagatc 1200
tacttcttcc gaggcagggc ctactggcgt ttccacccca gcaccggcg ttagacagt 1260
cccgtgccc gcagggccac tgactggaga ggggtgccct ctgagatcga cgctgcctt 1320
caggatgctg atggctatgc ctacttcctg cgcggccgcc tctactggaa gtttgacct 1380
gtgaaggatg aggctctgga aggcttcccc cgtctcgtgg gtcctgactt ctttggtgt 1440
gccgagcctg ccaacacttt cctctga 1467

```

<210> 2

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (0)...(0)
 <223> MMP-11 humana

10 <400> 2
 000

<210> 3
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos del dominio de unión a Zn de hMMP-11

20 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4, 6, 7, 9, 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

25 <400> 3

His Glu Xaa Xaa His Xaa Xaa Gly Xaa Xaa His

1 5 10

ES 2 370 040 T3

<210> 4
 <211> 1467
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> ADN que codifica hMMP-11 catalíticamente inactiva

<400> 4

10

```

atggctccgg ccgcctggct ccgcagcgcg gccgcgcgcg ccctcctgcc cccgatgctg 60
ctgctgctgc tccagccgcc gccgctgctg gccggggctc tgccgcegga cgeccaccac 120
ctccatgccg agaggagggg gccacagccc tggcatgcag ccctgcccag tagcccggca 180
cctgcccctg ccacgcagga agccccccgg cctgccagca gcctcaggcc tccccgctgt 240
ggcgtgcccg acccatctga tgggctgagt gcccgcaacc gacagaagag gttcgtgctt 300
tctggcgggc gctgggagaa gacggacctc acctacagga tccttcgggt cccatggcag 360
ttggtgcagg agcaggtgcg gcagacgatg gcagaggccc taaaggtatg gagcgatgtg 420
acgccactca cctttactga ggtgcacgag ggccgtgctg acatcatgat cgacttcgcc 480
aggtactggc atggggacga cctgccgttt gatgggcctg ggggcatcct ggccccatgcc 540
ttcttcccca agactcaccg agaaggggat gtccacttcg actatgatga gacctggact 600
atcggggatg accagggcac agacctgctg caggtggcag cccatgtgtt tggccacgtg 660
ctggggctgc agcacacaac agcagccaag gccctgatgt ccgccttcta cacctttcgc 720
taccactga gtctcagccc agatgactgc aggggcgttc aacacctata tggccagccc 780
tggcccactg tcacctccag gaccccagcc ctgggccccc aggctgggat agacaccaat 840

gagattgcac cgctggagcc agacgccccg ccagatgcct gtgaggcctc ctttgacgcg 900
gtctccacca tccgaggcga gctcttttct tcaaaagcgg gctttgtgtg gcgcctccgt 960
gggggccagc tgcagcccgg ctaccagca ttggcctctc gccactggca gggactgccc 1020
agccctgtgg acgctgcctt cgaggatgcc cagggccaca ttggttctt ccaaggtgct 1080
cagtactggg tgtacgacgg tgaaaagcca gtctgggcc ccgcacccct caccgagctg 1140
ggcctggtga ggttcccggc ccatgctgcc ttggtctggg gtcccagaaa gaacaagatc 1200
tacttcttcc gaggcagga ctactggcgt ttccaccca gcacccggcg tgtagacagt 1260
cccgtgcccc gcagggccac tgactggaga ggggtgccct ctgagatcga cgctgccttc 1320
caggatgctg atggctatgc ctacttcctg cggggccgcc tctactggaa gtttgacctt 1380
gtgaaggtga aggctctgga aggttcccc cgtctcgtgg gtctgactt ctttggtgtg 1440
gccgagcctg ccaacacttt cctctga 1467
    
```

ES 2 370 040 T3

<210> 5
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> hMMP-11 cat inactiva

<400> 5

10

```

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

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

ES 2 370 040 T3

gggggcccagc tgcagcccgg ctaccagct ctggcctctc gccactggca gggactgccc 1020
agccctgtgg acgctgcctt cgaggatgcc cagggccaca tttggttctt ccagggcgct 1080
cagtactggg tgtacgacgg cgaaaagcca gtgctgggccc ctgctcccct gaccgagctg 1140
ggcctggtga gattcccagt gcatgccgcc ctggtgtggg gacccgagaa gaacaaaatc 1200
tacttcttcc ggggcagggg ctactggaga ttccacccca gcacccggag agtggacagt 1260
cccgtgcca gaagggccac tgactggaga ggagtgcctt ctgagatcga cggcgccttc 1320
caggacgctg atggctatgc ctacttctctg cggcggcaggc tgtactggaa gtttgacctt 1380
gtgaaagtga aggctctgga aggttcccc agactgggtg gccctgactt ctttggtgtg 1440
gccgagcctg ccaacacttt cctgtgataa 1470

<210> 7
<211> 309
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN que codifica LTB sin el péptido señal

<400> 7
gctccccagt ctattacaga actatgttcg gaatatcgca acacacaaat atatacgata 60
aatgacaaga tactatcata tacggaatcg atggcaggta aaagagaaat ggttatcatt 120
acatttaaga gcggcgcaac atttcaggtc gaagtcccgg gcagtcaaca tatagactcc 180
caaaaaaaaaag ccattgaaag gatgaaggac acattaagaa tcacatatct gaccgagacc 240
aaaattgata aattatgtgt atggaataat aaaaccccca attcaattgc ggcaatcagt 300
atggaaaac 309

10
<210> 8
<211> 309
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN con codones optimizados que codifica LTB sin péptido
señal

20 <400> 8

gccccccaga gcatcaccga gctgtgcagc gagtaccgga acaccagat ttacaccatc 60

ES 2 370 040 T3

aacgacaaga tcttgagcta caccgagagc atggccggca agagggagat ggtgatcatc 120
 accttcaaga gcggcgccac cttccaggtg gaggtgcccg gcagccagca catcgacagc 180
 cagaagaagg ccacgagcgg gatgaaggac accctgcgga tcacctacct caccgagacc 240
 aagatcgaca agctgtgcgt gtggaacaac aagaccccca acagcatcgc cgccatcagc 300
 atggagaat 309

5 <210> 9
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> LTB sin la secuencia señal
 <400> 9

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

15 <210> 10
 <211> 593
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> polipéptido de fusión de hMMP-11-LTB catalíticamente
 inactiva
 <400> 10

ES 2 370 040 T3

	260		265		270														
Pro	Gln	Ala	Gly	Ile	Asp	Thr	Asn	Glu	Ile	Ala	Pro	Leu	Glu	Pro	Asp				
	275						280					285							
Ala	Pro	Pro	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Ser	Phe	Asp	Ala	Val	Ser	Thr	Ile				
	290					295					300								
Arg	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	Phe	Lys	Ala	Gly	Phe	Val	Trp	Arg	Leu	Arg				
305					310					315					320				
Gly	Gly	Gln	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Pro	Ala	Leu	Ala	Ser	Arg	His	Trp				
			325						330					335					
Gln	Gly	Leu	Pro	Ser	Pro	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Glu	Asp	Ala	Gln	Gly				
		340						345					350						
His	Ile	Trp	Phe	Phe	Gln	Gly	Ala	Gln	Tyr	Trp	Val	Tyr	Asp	Gly	Glu				
	355						360						365						
Lys	Pro	Val	Leu	Gly	Pro	Ala	Pro	Leu	Thr	Glu	Leu	Gly	Leu	Val	Arg				
	370					375						380							
Phe	Pro	Val	His	Ala	Ala	Leu	Val	Trp	Gly	Pro	Glu	Lys	Asn	Lys	Ile				
385				390						395					400				
Tyr	Phe	Phe	Arg	Gly	Arg	Asp	Tyr	Trp	Arg	Phe	His	Pro	Ser	Thr	Arg				
			405						410					415					
Arg	Val	Asp	Ser	Pro	Val	Pro	Arg	Arg	Ala	Thr	Asp	Trp	Arg	Gly	Val				
		420					425						430						
Pro	Ser	Glu	Ile	Asp	Ala	Ala	Phe	Gln	Asp	Ala	Asp	Gly	Tyr	Ala	Tyr				
	435					440						445							
Phe	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Tyr	Trp	Lys	Phe	Asp	Pro	Val	Lys	Val	Lys				
	450				455						460								
Ala	Leu	Glu	Gly	Phe	Pro	Arg	Leu	Val	Gly	Pro	Asp	Phe	Phe	Gly	Cys				
465				470						475					480				
Ala	Glu	Pro	Ala	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Arg	Ala	Pro	Gln	Ser	Ile	Thr				
			485						490					495					
Glu	Leu	Cys	Ser	Glu	Tyr	Arg	Asn	Thr	Gln	Ile	Tyr	Thr	Ile	Asn	Asp				
		500						505						510					
Lys	Ile	Leu	Ser	Tyr	Thr	Glu	Ser	Met	Ala	Gly	Lys	Arg	Glu	Met	Val				
	515						520					525							
Ile	Ile	Thr	Phe	Lys	Ser	Gly	Ala	Thr	Phe	Gln	Val	Glu	Val	Pro	Gly				
	530				535						540								
Ser	Gln	His	Ile	Asp	Ser	Gln	Lys	Lys	Ala	Ile	Glu	Arg	Met	Lys	Asp				
545				550						555					560				

ES 2 370 040 T3

Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys
 565 570 575
 Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Glu
 580 585 590
 Asn

<210> 11
 <211> 1779
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> polipéptido de fusión de hMMP-11-LTB catalíticamente
 10 inactiva

<400> 11

atggetcegg ccgcctggct ccgcagcgcg gccgcgcgcg ccctcctgcc cccgatgctg 60
 ctgetgetgc tccagccgcc gccgctgctg gcccgggctc tgccgccgga cgcccaccac 120
 ctccatgccg agaggagggg gccacagccc tggcatgcag ccctgcccag tagcccggca 180
 cctgcccctg ccacgcagga agccccccgg cctgccagca gcctcaggcc tccccgctgt 240
 ggcgtgcccg acccatctga tgggctgagt gcccgcaacc gacagaagag gttcgtgctt 300
 tctggcgggc gctgggagaa gacggacctc acctacagga tccttcgggt cccatggcag 360
 ttggtgcagg agcaggtgcg gcagacgatg gcagaggccc taaaggtatg gagcgatgtg 420
 acgccactca cctttactga ggtgcacgag ggcctgctg acatcatgat cgacttcgcc 480
 aggtactggc atggggacga cctgcccgtt gatgggcctg ggggcatect ggcccagcc 540
 ttcttcccca agactcaccg agaaggggat gtccacttcg actatgatga gacctggact 600
 atcggggatg accagggcac agacctgctg caggtggcag cccatgtgtt tggccacgtg 660
 ctggggctgc agcacacaac agcagccaag gccctgatgt ccgccttcta cacctttcgc 720
 taccactga gtctcagccc agatgactgc aggggcgttc aacacctata tggccagccc 780
 tggcccactg tcacctccag gaccccagcc ctggggcccc aggctgggat agacaccaat 840
 gagattgcac cgctggagcc agacgccccg ccagatgcct gtgaggcctc ctttgacgcg 900
 gtctccacca tccgaggcga gctctttttc ttcaaagcgg gctttgtgtg gcgcctccgt 960
 gggggccagc tgcagcccgg ctaccagca ttggcctctc gccactggca gggactgccc 1020
 agccctgtgg acgctgcctt cgaggatgcc cagggccaca tttggttctt ccaaggtgct 1080
 cagtactggg tgtacgacgg tgaaaagcca gtcctgggcc ccgcaccct caccgagctg 1140

ES 2 370 040 T3

ggectggtga ggttcccggg ccatgctgcc ttggtctggg gtcccgagaa gaacaagatc 1200
 tacttcttcc gaggcagggg ctactggcgt ttccacccca gcaccggcg tntagacagt 1260
 cccgtgcccc gcagggccac tgactggaga ggggtgcct ctgagatcga cgtgccttc 1320
 caggatgctg atggetatgc ctacttctg cgcggccgcc tctactggaa gtttgacct 1380
 gtgaagggtga aggctctgga aggcttcccc cgtctcgtgg gtctgactt ctttggctgt 1440
 gccgagcctg ccaacacttt cctctctaga gccccccaga gcatcaccga gctgtgcagc 1500
 gagtaccgga acaccagat ttacaccatc aacgacaaga tcctgagcta caccgagagc 1560
 atggccggca agagggagat ggtgatcctc acctcaaga gcggcgccac cttccaggtg 1620
 gaggtgcccg gcagccagca catcgacagc cagaagaagg ccatcgagcg gatgaaggac 1680
 accctgcgga tcacctacct caccgagacc aagatcgaca agctgtgcgt gtggaacaac 1740
 aagaccccca acagcatcgc cgccatcagc atggagaat 1779

<210> 12
 <211> 1785
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> ADN con codones optimizados que codifica
 hMMP-11-LTB catalíticamente inactiva

<400> 12

atggctcctg ccgcctggct gagaagcgt gccgctagag ccctgctgcc ccctatgctg 60
 ctgctcctgc tgcagcctcc tcctctgctg gctegggctc tgectcctga cgtgcaccac 120
 ctgcatgccg agaggagggg gccacagccc tggcatgctg ccctgcccag tagccctgct 180
 cctgccccctg ccacacagga agccccaga cctgccagca gcctgaggcc tcccagatgt 240
 ggcgtgcccg acccatctga tgggctgagt gcccgcaacc ggcagaagag atctgtgctg 300
 tctggcggac gctgggagaa aaccgacctg acctacagga tcctgcggtt cccatggcag 360
 ctggtgcagg aacaggtgcg gcagacaatg gctgaggccc tgaaagtgtg gagcgatgtg 420
 accccactga ccttactga agtgcacgag ggcaggctg acctatgat cgacttcgcc 480
 cggactggc atggggacga cctgcctttt gatgggcctg ggggcatcct ggcccatgcc 540
 ttcttcccca aaactcaccg ggaaggggat gtgacttcg actatgatga gacctggact 600
 atcggggatg accagggcac agacctgctg caggtggccg cccatgtgtt tggccacgtg 660
 ctggggctgc agcacacaac agctgccaag gccctgatgt ccgccttcta caccttctgc 720
 taccactga gtctgagccc agatgactgc agggcgctgc agcacctgta tggccagccc 780
 tggcccactg tgacctccag gaccccagcc ctgggcccc aggctgggat tgacaccaat 840
 gagattgccc ccctggagcc agacgcccct ccagatgcct gtgaggcctc ctttgacgcc 900

ES 2 370 040 T3

```

gtgtccacca tcagaggcga gctgtttttc ttcaaggccg gctttgtgtg gagactgaga 960
gggggcccage tgcagcccgg ctaccagct ctggcctctc gccactggca gggactgccc 1020
agccctgtgg acgctgcctt cgaggatgcc cagggccaca tttggttctt ccagggcgct 1080
cagtactggg tgtacgacgg cgaaaagcca gtgctgggccc ctgctcccct gaccgagctg 1140
ggcctggtga gattcccagt gcatgccgcc ctggtgtggg gacccgagaa gaacaaaatc 1200
tacttcttcc ggggcagga ctactggaga ttccaccca gcacccggag agtggacagt 1260
cccgtagcca gaagggccac tgactggaga ggagtgcct ctgagatcga cggcgccttc 1320
caggacgctg atggetatgc ctacttctg cgggcaggc tgtactggaa gtttgacct 1380
gtgaaagtga aggctctgga aggcttcccc agactggtgg gccctgactt ctttggtgt 1440
gccgagcctg ccaacacttt cctgtctaga gcccccaaga gcatcaccga gctgtgcagc 1500
gagtaccgga acaccagat ttacaccatc aacgacaaga tcctgagcta caccgagagc 1560
atggccggca agaggagat ggtgatcatc acctcaaga gggcgccac cttccaggtg 1620
gaggtgcccg gcagccagca catcgacagc cagaagaagg ccatcgagcg gatgaaggac 1680
accctgcgga tcacctacct caccgagacc aagatcgaca agctgtgcgt gtggaacaac 1740
aagaccccca acagcatcgc cgccatcagc atggagaatt gataa 1785

```

<210> 13
 <211> 1621
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ADN con codones optimizados que codifica
 10 mMMP-11 catalíticamente inactiva y regiones flanqueantes

<400> 13

```

ctgcagagat ctggtaccga tategccacc atggccagag ccgcctgcct gctgagagcc 60
atcagcagag tgctgctgct gcctctgcca ctgctgctcc tgttgctgct cctgctgcct 120
agccctctga tggccagagc taggcctcct gagagccaca gacaccacc tgtgaagaag 180
ggccctagac tgctgcacgc cgccctgcct aacacctga ccagcgtgcc tgccagccac 240
tgggtgccaa gccctgccgg cagcagcaga cctctgagat gtggcgtgcc tgacctgcct 300
gacgtgctga acgccaggaa caggcagaag cggttcgtgc tgagcggcgg cagatgggaa 360
aagaccgacc tgacctacag gatcctgaga ttcccctggc agctggtgcg tgagcaagtg 420
cgtcagaccg tggccgaggc cctccaggtg tggagcaggg tgacccctct gaccttcacc 480
gaggtgcacg agggcagagc cgacatcatg atcgacttcg ccagatactg gcacggcgac 540
aacctgcctt tcgacggccc tggcggcatc ctggcccacy cctttttccc caagaccac 600
agagagggcg acgtgcactt cgactacgac gagacctgga ccatcggcga taaccagggc 660

```

ES 2 370 040 T3

accgacctgc tccaggtggc cgcccacgct ttcggccacg tgctgggect ccagcacacc 720
accgccgcca aggcctgat gagccccttc tacacctca gataccccct gagcctgagc 780
cctgacgaca gaagaggcat ccagcacctg tacggcagac etcagatggc ccctaccagc 840
cctgccccta ccctgagcag ccaggccggc accgacacca acgagatcgc cctgctggag 900
cctgagaccc ctctgatgt gtgcgagacc agcttcgacg ccgtgtctac catcagaggc 960
gagctgttct tcttcaaggc cggctttgtg tggagactga ggagcggcag actccagcct 1020
ggctaccctg ccctggccag cagacactgg cagggcctgc cttcccctgt ggacgccgcc 1080
ttcgaggacg cccagggcca gatttggttc ttccagggcg cccagtactg ggtgtacgac 1140
ggcgagaagc ctgtgctggg ccctgccccca ctgagcaagc tgggactcca gggcagccct 1200
gtgcacgctg ccctgggtgtg gggacctgaa aagaacaaaa tctatttctt cagaggcggc 1260
gactactgga gattccaccc caggaccag agagtggaca accccgtgcc cagaagaagc 1320
accgactgga gaggcgtgcc tagcgagatc gacgccgctt tccaggatgc tgagggctac 1380
gcctacttcc tgaggggcca cctgtactgg aagttcgacc ccgtgaaggt gaaggtgctg 1440
gagggcttcc ctagacctgt gggccctgac ttcttcgact gcgccgagcc tgccaacacc 1500
ttccggctca gatgataagt gactaaatga gaattcgtcg acgcggccgc cggcggtagt 1560
cgtacctctt aactattaga tctactatc actgatttac tcttaagcag ctgcgccggc 1620
g 1621

<210> 14

<211> 1972

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> ADN con codones optimizados que cataliza el polipéptido de fusión de mMMP-11-LTB catalíticamente inactiva y regiones flanqueantes.

<400> 14

ctgcagagat ctggtaccga tatcgccacc ctgcagagat ctggtaccga tatcgccacc 60
atggccagag ccgcctgcct gctgagagcc atcagcagag tgctgctgct gcctctgcca 120
ctgctgctcc tgttctgct cctgctgcct agccctctga tggccagagc taggcctcct 180
gagagccaca gacaccacc tgtgaagaag ggcctagac tgctgcacgc cgcctgcct 240
aacaccctga ccagcgtgcc tgccagccac tgggtgcca gccctgccg cagcagcaga 300
cctctgagat gtggcgtgcc tgacctgcct gacgtgctga acgccaggaa caggcagaag 360
cggttcgtgc tgagcggcgg cagatgggaa aagaccgacc tgacctacag gatcctgaga 420
ttcccctggc agctgggtgcg tgagcaagtg cgtcagaccg tggccgagcc cctccaggtg 480

ES 2 370 040 T3

tggagcgagg tgacccctct gaccttcacc gaggtgcacg agggcagagc cgacatcatg 540
atcgacttcg ccagatactg gcacggcgac aacctgcctt tcgacggccc tggcggcatc 600
ctggcccacg cctttttccc caagaccac agagagggcg acgtgcactt cgactacgac 660
gagacctgga ccatcggcga taaccagggc accgacctgc tccaggtggc cgcccacgct 720
ttcggccacg tgctgggect ccagcacacc accgccgcca aggcctgat gagecccttc 780
tacacettca gataccccct gagcctgagc cctgacgaca gaagaggcat ccagcacctg 840
tacggcagac ctccagatggc ccctaccagc cctgccccta ccctgagcag ccaggccggc 900
accgacacca acgagatcgc cctgctggag cctgagacct ctctgatgt gtgcgagacc 960
agcttcgacg ccgtgtctac catcagaggc gagctgttct tcttcaaggc cggtttgtg 1020
tggagactga ggagcggcag actccagcct ggctaccctg ccctggccag cagacactgg 1080
cagggcctgc cttcccctgt ggacgcgcc ttcgaggacg cccagggcca gatttggttc 1140
ttccagggcg cccagtactg ggtgtacgac ggcgagaagc ctgtgctggg cctgcccga 1200
ctgagcaagc tgggactcca gggcagccct gtgcacgctg ccctgggtgtg gggacctgaa 1260
aagaacaaaa tctatttctt cagagggcggc gactactgga gattccacce caggaccag 1320
agagtggaca acccctgccc cagaagaagc accgactgga gaggcgtgcc tagcgagatc 1380
gacgcegett tccaggatgc tgagggctac gcctacttcc tgaggggcca cctgtactgg 1440
aagttcgacc ccgtgaaggt gaaggtgetg gagggcttcc ctagacctgt gggccctgac 1500
ttcttcgact gcgccgagcc tgccaacacc ttccggtcta gagccccca gagcatcacc 1560
gagctgtgca gcgagtaccg gaacaccag atttacacca tcaacgaaa gatcctgagc 1620
tacaccgaga gcattggccg caagagggag atggtgatca tcaccttcaa gagcggcgcc 1680
accttccagg tggaggtgcc cggcagccag cacatcgaca gccagaagaa ggccatcgag 1740
cggatgaagg acaccctgcg gatcacctac ctaccgaga ccaagatcga caagctgtgc 1800
gtgtggaaca acaagacccc caacagcatc gccgccatca gcatggagaa ttgataatct 1860
agatgataag tgactaaatg agaattcgtc gacgcggccg ccggcggtag tcgtacctct 1920
taactattag atctactatt cactgattta ctcttaagca gctgcgccgg cg 1972

<210> 15
<211> 597
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> polipéptido de fusión de hMMP-11-LTB catalíticamente
inactiva

<400> 15

Met Ala Arg Ala Ala Cys Leu Leu Arg Ala Ile Ser Arg Val Leu Leu

ES 2 370 040 T3

1				5						10				15	
Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Ser	Pro								
				20					25					30	
Leu	Met	Ala	Arg	Ala	Arg	Pro	Pro	Glu	Ser	His	Arg	His	His	Pro	Val
		35						40				45			
Lys	Lys	Gly	Pro	Arg	Leu	Leu	His	Ala	Ala	Leu	Pro	Asn	Thr	Leu	Thr
		50					55					60			
Ser	Val	Pro	Ala	Ser	His	Trp	Val	Pro	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Ser	Arg
65					70					75					80
Pro	Leu	Arg	Cys	Gly	Val	Pro	Asp	Leu	Pro	Asp	Val	Leu	Asn	Ala	Arg
				85						90					95
Asn	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe	Val	Leu	Ser	Gly	Gly	Arg	Trp	Glu	Lys	Thr
				100						105					110
Asp	Leu	Thr	Tyr	Arg	Ile	Leu	Arg	Phe	Pro	Trp	Gln	Leu	Val	Arg	Glu
				115						120					125
Gln	Val	Arg	Gln	Thr	Val	Ala	Glu	Ala	Leu	Gln	Val	Trp	Ser	Glu	Val
				130											140
Thr	Pro	Leu	Thr	Phe	Thr	Glu	Val	His	Glu	Gly	Arg	Ala	Asp	Ile	Met
145						150					155				160
Ile	Asp	Phe	Ala	Arg	Tyr	Trp	His	Gly	Asp	Asn	Leu	Pro	Phe	Asp	Gly
				165						170					175
Pro	Gly	Gly	Ile	Leu	Ala	His	Ala	Phe	Phe	Pro	Lys	Thr	His	Arg	Glu
				180						185					190
Gly	Asp	Val	His	Phe	Asp	Tyr	Asp	Glu	Thr	Trp	Thr	Ile	Gly	Asp	Asn
				195						200					205
Gln	Gly	Thr	Asp	Leu	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	His	Ala	Phe	Gly	His	Val
				210											220
Leu	Gly	Leu	Gln	His	Thr	Thr	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	Met	Ser	Pro	Phe
225						230					235				240
Tyr	Thr	Phe	Arg	Tyr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Arg	Arg	Gly
				245							250				255
Ile	Gln	His	Leu	Tyr	Gly	Arg	Pro	Gln	Met	Ala	Pro	Thr	Ser	Pro	Ala
				260						265					270
Pro	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	Ala	Gly	Thr	Asp	Thr	Asn	Glu	Ile	Ala	Leu
				275											285
Leu	Glu	Pro	Glu	Thr	Pro	Pro	Asp	Val	Cys	Glu	Thr	Ser	Phe	Asp	Ala
				290											300

Val Ser Thr Ile Arg Gly Glu Leu Phe Phe Phe Lys Ala Gly Phe Val
 305 310 315 320
 Trp Arg Leu Arg Ser Gly Arg Leu Gln Pro Gly Tyr Pro Ala Leu Ala
 325 330 335
 Ser Arg His Trp Gln Gly Leu Pro Ser Pro Val Asp Ala Ala Phe Glu
 340 345 350
 Asp Ala Gln Gly Gln Ile Trp Phe Phe Gln Gly Ala Gln Tyr Trp Val
 355 360 365
 Tyr Asp Gly Glu Lys Pro Val Leu Gly Pro Ala Pro Leu Ser Lys Leu
 370 375 380
 Gly Leu Gln Gly Ser Pro Val His Ala Ala Leu Val Trp Gly Pro Glu
 385 390 395 400
 Lys Asn Lys Ile Tyr Phe Phe Arg Gly Gly Asp Tyr Trp Arg Phe His
 405 410 415
 Pro Arg Thr Gln Arg Val Asp Asn Pro Val Pro Arg Arg Ser Thr Asp
 420 425 430
 Trp Arg Gly Val Pro Ser Glu Ile Asp Ala Ala Phe Gln Asp Ala Glu
 435 440 445
 Gly Tyr Ala Tyr Phe Leu Arg Gly His Leu Tyr Trp Lys Phe Asp Pro
 450 455 460
 Val Lys Val Lys Val Leu Glu Gly Phe Pro Arg Pro Val Gly Pro Asp
 465 470 475 480
 Phe Phe Asp Cys Ala Glu Pro Ala Asn Thr Phe Arg Ser Arg Ala Pro
 485 490 495
 Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr
 500 505 510
 Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys
 515 520 525
 Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val
 530 535 540
 Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu
 545 550 555 560
 Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile
 565 570 575
 Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala
 580 585 590
 Ile Ser Met Glu Asn

ES 2 370 040 T3

<210> 16
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 16
10 cccggggcgg atggcacggg cgcctgtc 29

<210> 17
<211> 32
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

20 <221> características variadas
<222> (0)...(0)
<223> M es A o C y R es A o G

<400> 17
25 gtcagm gaa agtrttggca ggctcagcac ag 32

<210> 18
<211> 6717
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pV1JnsA-MMP-11(cat-)-LTBopt
35 <221> características variadas
<222> 357, 366, 5234
<223> n = A, T,C o G

<400> 18

ctagagcccc ccagagcadc accgagctgt gcagcgagta ccggaacacc cagatttaca 60
ccatcaacga caagatcctg agctacaccg agagcatggc cggcaagagg gagatggtga 120
tcatacactt caagagcggc gccaccttcc aggtggagggt gcccggcagc cagcacatcg 180
acagccagaa gaaggccatc gagcggatga aggacaccct gcggatcacc tacctcaccg 240
agaccaagat cgacaagctg tgcgtgtgga acaacaagac ccccaacagc atcgccgcca 300
tcagcatgga gaattgataa tctagatgat aagtgactaa atgagaattc gtcgacngcg 360
gccgngatc tgctgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccctgtc 420
cttcccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg 480
catcgcatcg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca 540
agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggccg 600
cagcggccag gtgctgaaga attgaccggg ttctcctgg gccagaaaga agcaggcaca 660
tcccccttctc tgtgacacac cctgtccacg cccctggttc ttagttccag cccactcat 720
aggacactca tagctcagga gggctccgcc ttcaatccca cccgctaaag tacttgagc 780
ggtctctccc tccctcatca gccacacaaa ccaaacctag cctccaagag tgggaagaaa 840
ttaaagcaag atagctatt aagtgcagag ggagagaaaa tgctccaac atgtgaggaa 900
gtaatgagag aatcataga atttcttccg ctctctcgt cactgactcg ctgcgctcgg 960
tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag 1020
aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 1080
gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca 1140
aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 1200
tccccctgag aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgcccgtt accggatacc 1260
tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tntaggtatc 1320
tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc 1380
ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact 1440
tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg 1500
ctacagagtt cttgaagtgg tgccctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg 1560
tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 1620
aacaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 1680
aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg 1740
aaaactcagc ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 1800
ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttgggtctg 1860
acagttacca atgcttaac agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat 1920

ccatagttgc ctgactcggg gggggggggc gctgaggtct gcctcgtgaa gaaggtgttg 1980
 ctgactcata ccaggcctga atcgcccat catccagcca gaaagtgagg gagccacggt 2040
 tgatgagagc tttgtttag gtggaccagt tggtgatttt gaacttttgc tttgccacgg 2100
 aacggtctgc gttgtcggga agatgcgtga tctgatcctt caactcagca aaagttcgat 2160
 ttattcaaca aagccgccgt cccgtcaagt cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca 2220
 attaaccaat tctgattaga aaaactcadc gagcatcaaa tgaaactgca atttattcat 2280
 atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc tgtaatgaag gaaaaaactc 2340
 accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg tctgcgattc cgactcgtcc 2400
 aacatcaata caacctatta atttcccctc gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc 2460
 accatgagtg acgactgaat cgggtgagaa tggcaaaagc ttatgcattt cttccagac 2520
 ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc atcaaaaatca ctgcgcatcaa ccaaaccggt 2580
 attcattcgt gattgcgct gagcgagacg aaatacgcga tcgctgttaa aaggacaatt 2640
 acaaacagga atcgaatgca accggcgcag gaacactgcc agcgcaccaa caatattttc 2700
 acctgaatca ggatattctt ctaatacctg gaatgctgtt tccccgggga tcgcagtgg 2760
 gagtaacat gcatcatcag gactacggat aaaatgcttg atggtcggaa gaggcataaa 2820
 ttcgctcagc cagtttagtc tgaccatctc atctgtaaca tcattggcaa cgctaccttt 2880
 gccatgtttc agaaacaact ctggcgcac cggcttccca tacaatcgat agattgtcgc 2940
 acctgattgc ccgacattat cgcgagccca tttataccca tataaatcag catccatggt 3000
 ggaatttaat cgcggcctcg agcaagacgt tccccgttga atatggctca taacaccct 3060
 tgtattactg tttatgtaag cagacagttt tattgttcat gatgatata tttatcttg 3120
 tgcaatgtaa catcagagat tttgagacac aacgtggctt tcccccccc cccattattg 3180
 aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaa 3240
 taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tetaagaaac 3300
 cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggcctt ttcgtctcgc 3360
 gcgtttcggg gatgacggtg aaaacctctg acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc 3420
 ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttg 3480
 cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc atcagagcag attgtactga gactgcacca 3540
 tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca gattggctat 3600
 tggccattgc atacgttgta tccatatcat aatatgtaca tttatattgg ctcatgtcca 3660
 acattaccgc catgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg 3720
 tcattagttc atagccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggg aatggcccg 3780
 cctggctgac cgcccaacga cccccccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata 3840
 gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaaactgcc 3900
 cactggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac 3960
 ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt tcctacttg 4020
 cagtacatct acgtattagt catcgtatc accatggtga tgcggttttg gcagtacatc 4080
 aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc 4140

aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc 4200
gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg aggtctatat aagcagagct 4260
cgttttagtga accgtcagat cgcttgagga cgccatccac gctgttttga cctccataga 4320
agacaccggg accgatccag cctccgcggc cgggaacggt gcattggaac gcggattccc 4380
cgtgccaaga gtgacgtaag taccgcctat agactctata ggcacacccc tttggctctt 4440
atgcatgcta tactgttttt ggcttggggc ctatacacc cgccttcctt atgctatagg 4500
tgatgggtata gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca ctcccctatt 4560
ggtgacgata ctttccatta ctaatccata acatggctct ttgccacaac tatctctatt 4620
ggctatatgc caatactctg tccttcagag actgacacgg actctgtatt tttacaggat 4680
ggggtcccat ttattattta caaattcaca tatacaacia cgccgtcccc cgtgccccga 4740
gtttttatta aacatagcgt gggatctcca cgcaaatctc gggtagctgt tccggacatg 4800
ggctcttctc cggtagcggc ggagcttcca catccgagcc ctggtoecat gcctccagcg 4860
gctcatggtc gctcggcagc tccttgctcc taacagtgga ggcagactt aggcacagca 4920
caatgcccac caccaccagt gtgccgcaca aggccgtggc ggtagggat gtgtctgaaa 4980
atgagcgtgg agattgggct cgcacggctg acgcagatgg aagacttaag gcagcggcag 5040
aagaagatgc aggcagctga gttgttgtat tctgataaga gtcagaggta actcccgttg 5100
cggtgctgtt aacgggtggag ggcagtgtag tctgagcagt actcgttgct gccgcgcgcg 5160
ccaccagaca taatagctga cagactaaca gactgttccct ttccatgggt cttttctgca 5220
gtcaccgtcc ttanagatct gatatgccca ccatggctcc tgccgcctgg ctgagaagcg 5280
ctgccgctag agccctgctg cccctatgc tgctgctcct gctgcagcct cctcctctgc 5340
tggctcgggc tctgcctcct gacgtgcacc acctgcatgc cgagaggagg gggccacagc 5400
cctggcatgc tgccctgcc agtagccctg ctctgcccc tgccacacag gaagccccca 5460
gacctgccag cagcctgagg cctcccagat gtggcgtgcc cgacccatct gatgggctga 5520
gtgcccgcaa cggcagaag agattcgtgc tgtctggcgg acgctgggag aaaaccgacc 5580
tgacctacag gatcctgcgg ttcccatggc agctgggtgca ggaacaggtg cggcagacaa 5640
tggctgagge cctgaaagtg tggagcgtat tgacccact gaccttact gaagtgcacg 5700
agggcagggc tgacatcatg atcgacttcg cccggtactg gcatggggac gacctgctt 5760
ttgatgggcc tgggggcac cctggccatg ccttcttccc caaaactcac cgggaagggg 5820
atgtgcactt cgactatgat gagacctgga ctatcgggga tgaccagggc acagacctgc 5880
tgcaggtggc cgcccatgtg tttggccacg tgctggggct gcagcacaca acagctgcca 5940
agggcctgat gtccgcctt tacacctttc gctaccact gagtctgagc ccagatgact 6000
gcaggggctg gcagcacctg tatggccagc cctggccac tgtgacctcc aggaccccag 6060
ccctgggccc ccaggctggg attgacacca atgagattgc cccctggag ccagacgcc 6120
ctccagatgc ctgtgaggcc tcctttgacg ccgtgtccac catcagaggc gagctgtttt 6180
tcttcaaggc cggctttgtg tggagactga gagggggcca gctgcagccc ggctaccag 6240
ctctggcctc tcgccactgg cagggactgc ccagccctgt ggacgctgcc ttcgaggatg 6300
cccagggcca catttggtt tcaccagggc ctcagtactg ggtgtacgac ggcgaaaagc 6360

ES 2 370 040 T3

cagtgctggg cctgctccc ctgaccgagc tgggcctggt gagattccca gtgcatgccg 6420
ccctggtgtg gggacccgag aagaacaaaa tctacttctt ccggggcagg gactactgga 6480
gattccacce cagcaccgag agagtggaca gtcccgtgcc cagaagggcc actgactgga 6540
gaggagtgcc ctctgagatc gacgccgect tccaggacgc tgatggctat gcctacttcc 6600
tgccgggcag gctgtactgg aagttgacc ctgtgaaagt gaaggctctg gaaggcttcc 6660
ccagactggt gggccctgac ttctttgget gtgccgagcc tgccaacact ttctgt 6717

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene una metaloproteinasa 11 de la matriz (MMP-11) catalíticamente inactiva unida a una subunidad B la la toxina termolábil (LTB) de *E. coli*, en el que la secuencia señal de la LTB está eliminada, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 10.
2. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N.º 11 o 12.
3. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 unido de forma operable a un promotor.
- 10 4. Una célula huésped aislada que contiene el vector de expresión de la reivindicación 3 en su interior.
5. Un procedimiento para expresar un polipéptido de fusión de MMP-11 en una célula huésped aislada, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 en un medio de cultivo celular bajo condiciones para producir el polipéptido de fusión.
- 15 6. Un polipéptido de fusión que comprende una metaloproteinasa de la matriz 11 (MMP-11) catalíticamente inactiva unida a una subunidad B la la toxina termolábil (LTB) de *E. coli*, en el que la LTB no incluye una secuencia señal y el que el polipéptido incluye la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 10.
7. Una vacuna que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Una vacuna que comprende un polipéptido de la reivindicación 6 y un adyuvante.
- 20 9. Un ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 o un polipéptido de la reivindicación 6 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.
10. Un ácido nucleico para su uso o un polipéptido para su uso de la reivindicación 9 en el que la terapia es el tratamiento de un carcinoma.
- 25 11. El ácido nucleico para su uso o un polipéptido para su uso de la reivindicación 10 en el que el carcinoma es invasivo y se selecciona de mama, colon, cabeza y cuello, pulmón, ovario, páncreas, próstata, piel (carcinoma de células basales) y útero (carcinoma de cuello uterino y carcinoma de endometrio).
12. Uso de un ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 o un polipéptido de la reivindicación 6 para la fabricación de un medicamento para tratar un carcinoma.
- 30 13. El uso de la reivindicación 12 en el que el carcinoma es invasivo y se selecciona de mama, colon, cabeza y cuello, pulmón, ovario, páncreas, próstata, piel (carcinoma de células basales) y útero (carcinoma de cuello uterino y carcinoma de endometrio).

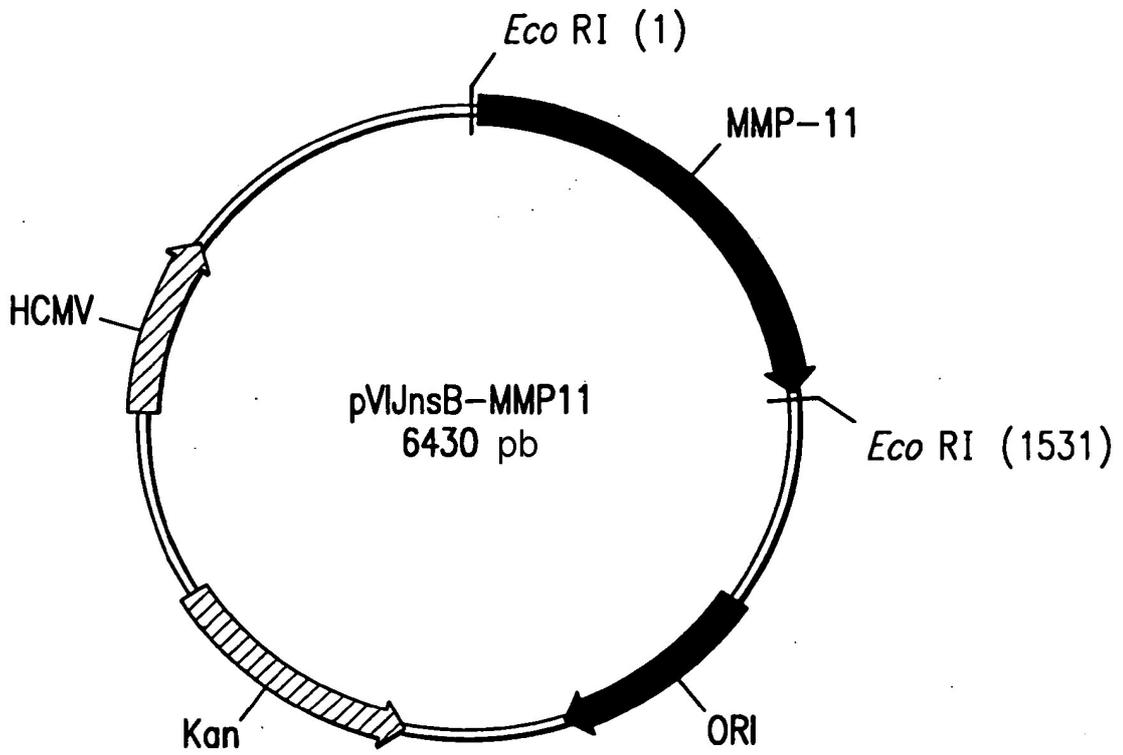


FIG.1

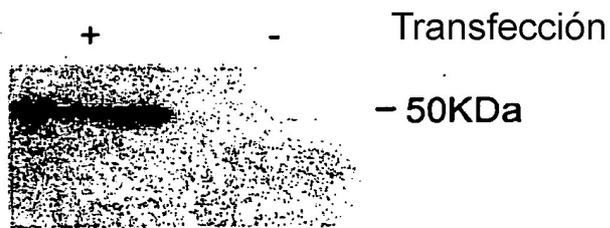


FIG.2

1 *CTGCAGAGAT CTGGTACCGA TATCGCCACC ATGGCCAGAG CCGCCTGCCT*
GCTGAGAGCC ATCAGCAGAG TGCTGCTGCT GCCTCTGCCA CTGCTGCTCC
 101 *TGTTGCTGCT CCTGCTGCCT AGCCCTCTGA TGGCCAGAGC TAGGCCTCCT*
GAGAGCCACA GACACCACCC TGTGAAGAAG GGCCCTAGAC TGCTGCACGC
 201 *CGCCCTGCCT AACACCCTGA CCAGCGTGCC TGCCAGCCAC TGGGTGCCAA*
GCCCTGCCGG CAGCAGCAGA CCTCTGAGAT GTGGCGTGCC TGACCTGCCT
 301 *GACGTGCTGA ACGCCAGGAA CAGGCAGAAG CGGTTCTGTC TGAGCGGCGG*
CAGATGGGAA AAGACCGACC TGACCTACAG GATCCTGAGA TTCCCCTGGC
 401 *AGCTGGTGCG TGAGCAAGTG CGTCAGACCG TGGCCGAGGC CCTCCAGGTG*
TGGAGCGAGG TGACCCCTCT GACCTTCACC GAGGTGCACG AGGGCAGAGC
 501 *CGACATCATG ATCGACTTCG CCAGATACTG GCACGGCGAC AACCTGCCTT*
TCGACGGCCC TGGCGGCATC CTGGCCCACG CCTTTTTCCC CAAGACCCAC
 601 *AGAGAGGGCG ACGTGC ACTT CGACTACGAC GAGACCTGGA CCATCGGCCA*
TAACCAGGGC ACCGACCTGC TCCAGGTGGC CGCCCACGCT TTCGGCCACG
 701 *TGCTGGGCCT CCAGCACACC ACCGCCGCCA AGGCCCTGAT GAGCCCCTTC*
TACACCTTCA GATACCCCTT GAGCCTGAGC CCTGACGACA GAAGAGGCAT
 801 *CCAGCACCTG TACGGCAGAC CTCAGATGGC CCCTACCAGC CCTGCCCCTA*
CCCTGAGCAG CCAGGCCGGC ACCGACACCA ACGAGATCGC CCTGCTGGAG
 901 *CCTGAGACCC CTCCTGATGT GTGCGAGACC AGCTTCGACG CCGTGTCTAC*
CATCAGAGGC GAGCTGTTCT TCTTCAAGGC CGGCTTTGTG TGGAGACTGA
 1001 *GGAGCGGCAG ACTCCAGCCT GGCTACCCTG CCCTGGCCAG CAGACACTGG*
CAGGGCCTGC CTTCCCCTGT GGACGCCGCC TTCGAGGACG CCCAGGGCCA
 1101 *GATTTGGTTC TTCCAGGGCG CCCAGTACTG GGTGTACGAC GGCGAGAAGC*
CTGTGCTGGG CCCTGCCCCA CTGAGCAAGC TGGGACTCCA GGGCAGCCCT
 1201 *GTGCACGCTG CCCTGGTGTG GGGACCTGAA AAGAACAAA TCTATTTCTT*
CAGAGGCGGC GACTACTGGA GATTCCACCC CAGGACCCAG AGAGTGGACA
 1301 *ACCCCGTGCC CAGAAGAAGC ACCGACTGGA GAGGCGTGCC TAGCGAGATC*
GACGCCGCTT TCCAGGATGC TGAGGGCTAC GCCTACTTCC TGAGGGGCCA
 1401 *CCTGTACTGG AAGTTCGACC CCGTGAAGGT GAAGGTGCTG GAGGGCTTCC*
CTAGACCTGT GGGCCCTGAC TTCTTCGACT GCGCCGAGCC TGCCAACACC
 1501 *TTCCGGTCTA GATGATAAGT GACTAAATGA GAATTCGTCG ACGCGGCCGC*
CGGCGGTAGT CGTACCTCTT AACTATTAGA TCTACTATTC ACTGATTTAC
 1601 *TCTTAAGCAG CTGCGCCGGC G*

FIG. 3

1 CTGCAGAGAT CTGGTACCGA TATCGCCACC ATGGCCAGAG CCGCCTGCCT
 GCTGAGAGCC ATCAGCAGAG TGCTGCTGCT GCCTCTGCCA CTGCTGCTCC
 101 TGTTGCTGCT CCTGCTGCCT AGCCCTCTGA TGGCCAGAGC TAGGCCTCCT
 GAGAGCCACA GACACCACCC TGTGAAGAAG GGCCCTAGAC TGCTGCACGC
 201 CGCCCTGCCT AACACCCTGA CCAGCGTGCC TGCCAGCCAC TGGGTGCCAA
 GCCCTGCCGG CAGCAGCAGA CCTCTGAGAT GTGGCGTGCC TGACCTGCCT
 301 GACGTGCTGA ACGCCAGGAA CAGGCAGAAG CGGTTCGTGC TGAGCGGCGG
 CAGATGGGAA AAGACCGACC TGACCTACAG GATCCTGAGA TTCCCCTGGC
 401 AGCTGGTGCG TGAGCAAGTG CGTCAGACCG TGGCCGAGGC CCTCCAGGTG
 TGGAGCGAGG TGACCCCTCT GACCTTCACC GAGGTGCACG AGGGCAGAGC
 501 CGACATCATG ATCGACTTCG CCAGATACTG GCACGGCGAC AACCTGCCTT
 TCGACGGCCC TGGCGGCATC CTGGCCCACG CCTTTTTCCC CAAGACCCAC
 601 AGAGAGGGCG ACGTGCACTT CGACTACGAC GAGACCTGGA CCATCGGCCA
 TAACCAGGGC ACCGACCTGC TCCAGGTGGC CGCCCACGCT TTCGGCCACG
 701 TGCTGGGCCT CCAGCACACC ACCGCCGCCA AGGCCCTGAT GAGCCCCTTC
 TACACCTTCA GATACCCCTT GAGCCTGAGC CCTGACGACA GAAGAGGCAT
 801 CCAGCACCTG TACGGCAGAC CTCAGATGGC CCCTACCAGC CCTGCCCCTA
 CCCTGAGCAG CCAGGCCGGC ACCGACACCA ACGAGATCGC CCTGCTGGAG
 901 CCTGAGACCC CTCCTGATGT GTGCGAGACC AGCTTCGACG CCGTGTCTAC
 CATCAGAGGC GAGCTGTTCT TCTTCAAGGC CGGCTTTGTG TGGAGACTGA
 1001 GGAGCGGCAG ACTCCAGCCT GGCTACCCTG CCCTGGCCAG CAGACACTGG
 CAGGGCCTGC CTTCCCCTGT GGACGCCGCC TTCGAGGACG CCCAGGGCCA
 1101 GATTTGGTTC TTCCAGGGCG CCCAGTACTG GGTGTACGAC GGCAGAAAGC
 CTGTGCTGGG CCCTGCCCCA CTGAGCAAGC TGGGACTCCA GGGCAGCCCT
 1201 GTGCACGCTG CCCTGGTGTG GGGACCTGAA AAGAACAAA TCTATTTCTT
 CAGAGGCGGC GACTACTGGA GATTCCACCC CAGGACCCAG AGAGTGGACA
 1301 ACCCCGTGCC CAGAAGAAGC ACCGACTGGA GAGCCGTGCC TAGCGAGATC
 GACGCCGCTT TCCAGGATGC TGAGGGCTAC GCCTACTTCC TGAGGGGCCA
 1401 CCTGTACTGG AAGTTCGACC CCGTGAAGGT GAAGGTGCTG GAGGGCTTCC
 CTAGACCTGT GGGCCCTGAC TTCTTCGACT GCGCCGAGCC TGCCAACACC
 1501 TTCCGGTCTA GAgcccccca gagcatcacc gagctgtgca gcgagtaccg
 gaacaccag atttacacca tcaaeagaca gatcctgagc tacaccgago
 1601 gcatggccgg caagaggag atggtgatca tcacctcaa gagcggcgcc
 acctlccagg tggaggtgcc cggcagccag cacatcgaca gccagaagaa
 1701 ggccategag cggatgaagg acacctgag gatcacctac ctacaccgago
 ccaagataga caagctgtgc gtgtggaaca acaagacccc caacagcatc
 1801 gccgccatca gcatggagaa tTGATAATCT AGATGATAAG TACTAAATG
 AGAATTCGTC GACGCGGCCG CCGCGGGTAG TCGTACCTCT TAACTATTAGA
 1901 TCTACTATTC ACTGATTAC TCTTAAGCAG CTGCGCCGGC G

FIG.4

1 MARAACLLRA ISRVLLLPL LLLLLLLLLP SPLMARARPP ESHRHHPVKK
 51 GPRLLHAALP NTLTSVPASH WPSPAGSSR PLRCGVDPDP DVLNARNRQK
 101 RFVLSGGRWE KTDLYRILR FPWQLVREQV RQTVAEALQV WSEVTPLTFT
 151 EVHEGRADIM IDFARYWHGD NLPFDGPGGI LAHAFFPKTH REGDVHFDYD
 201 ETWTIGDNQG TDLLQVAAHA FGHVLGLQHT TAAKALMSPF YTFRYPLSLS
 251 PDDRRGIQHL YGRPQMPTS PAPTSSQAG TDTNEIALLE PETPPDVCET
 301 SFDAVSTIRG ELFFFKAGFV WRLRSGRLQP GYPALASRHW QGLPSPVDAA
 351 FEDAQQIWF FQGAQYWYD GEKPVLPAP LSKLGLQGSP VHAALVWGPE
 401 KNKIYFFRGG DYWRFHPRTQ RVDNPVRRS TDWRGVPSEI DAAFQDAEGY
 451 AYFLRGHLYW KFDPVKVKVL EGFPRVPGPD FFDCAEPANT FRSRAPQSIT
 501 *ELCSEYRNTQ IYTINDKILS YTESMAGKRE MVIITFKSGA TFQVEVPGSQ*
 551 *HIDSQKKAIE RMKDTLRITY LTETKIDKLC VVNNKTPNSI AAISMEN*

FIG. 5

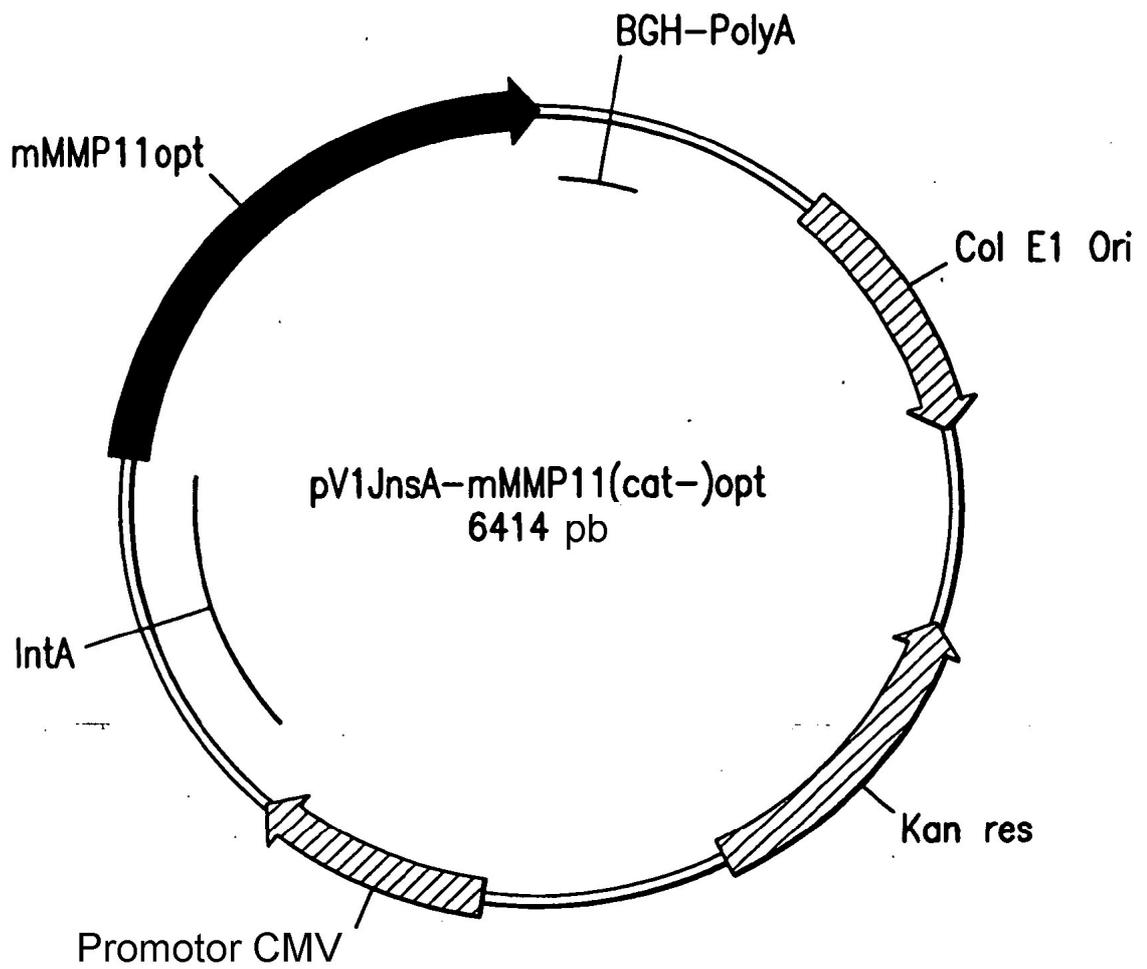


FIG.6A

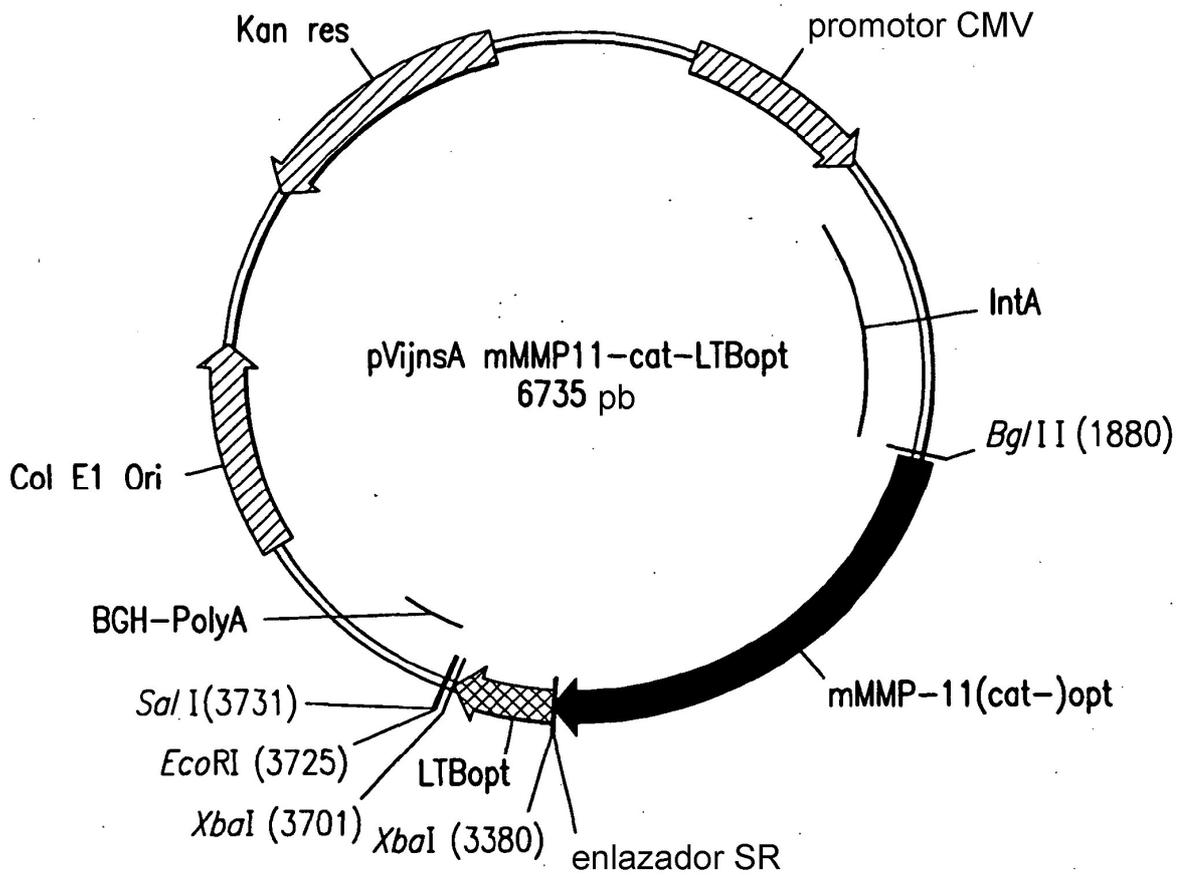


FIG.6B

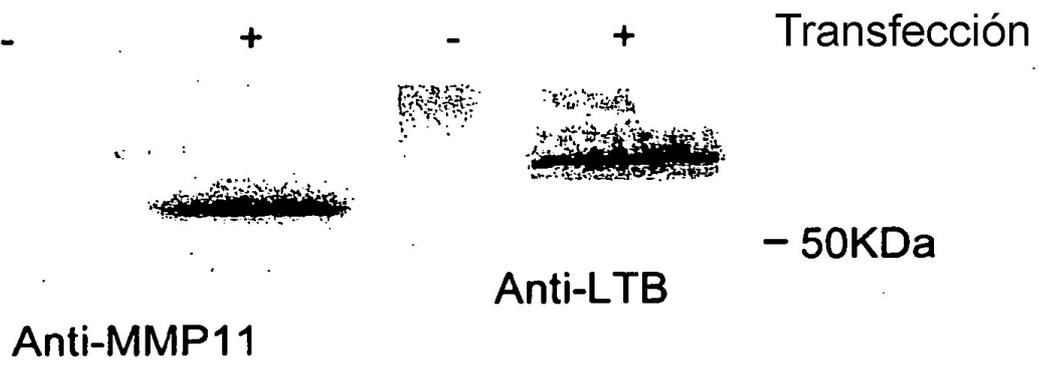


FIG.7

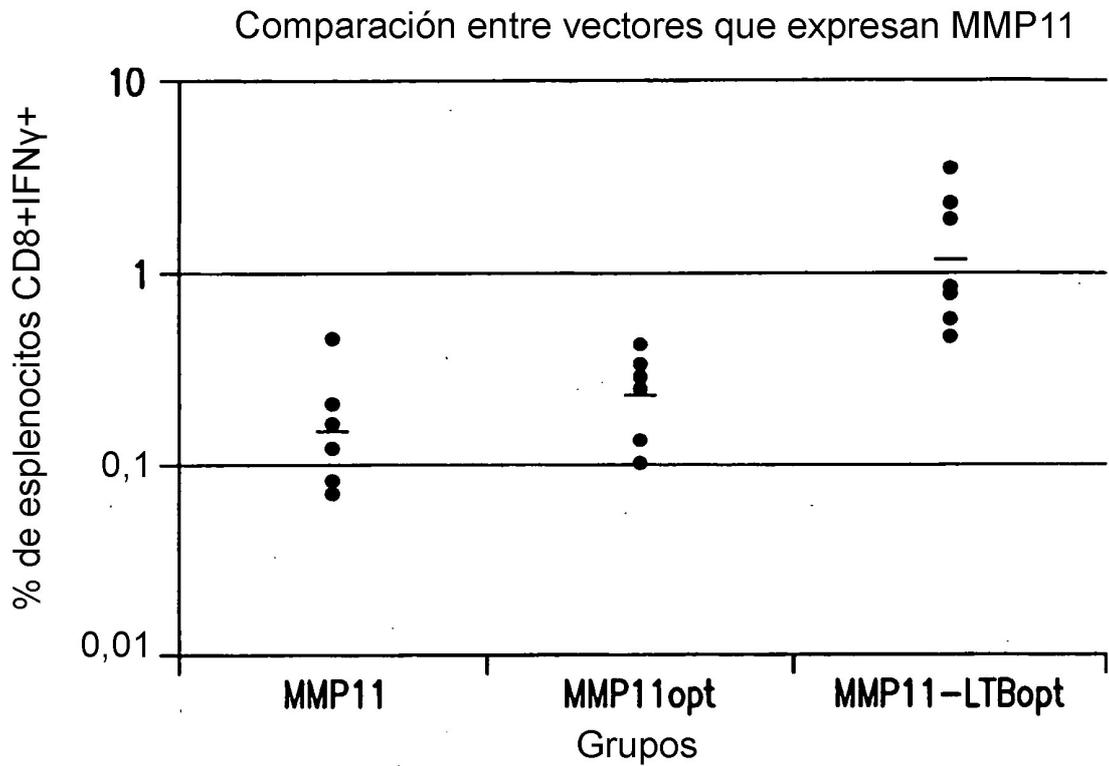


FIG.8

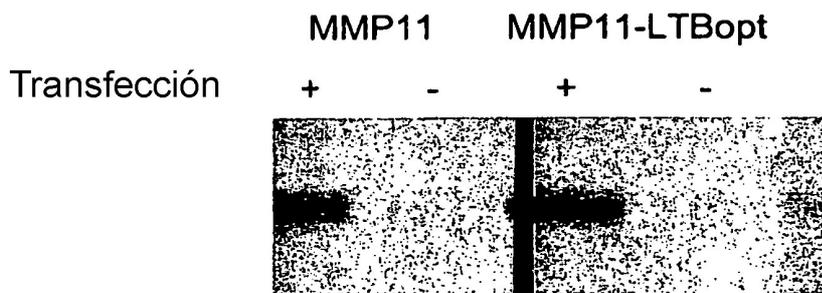


FIG.9

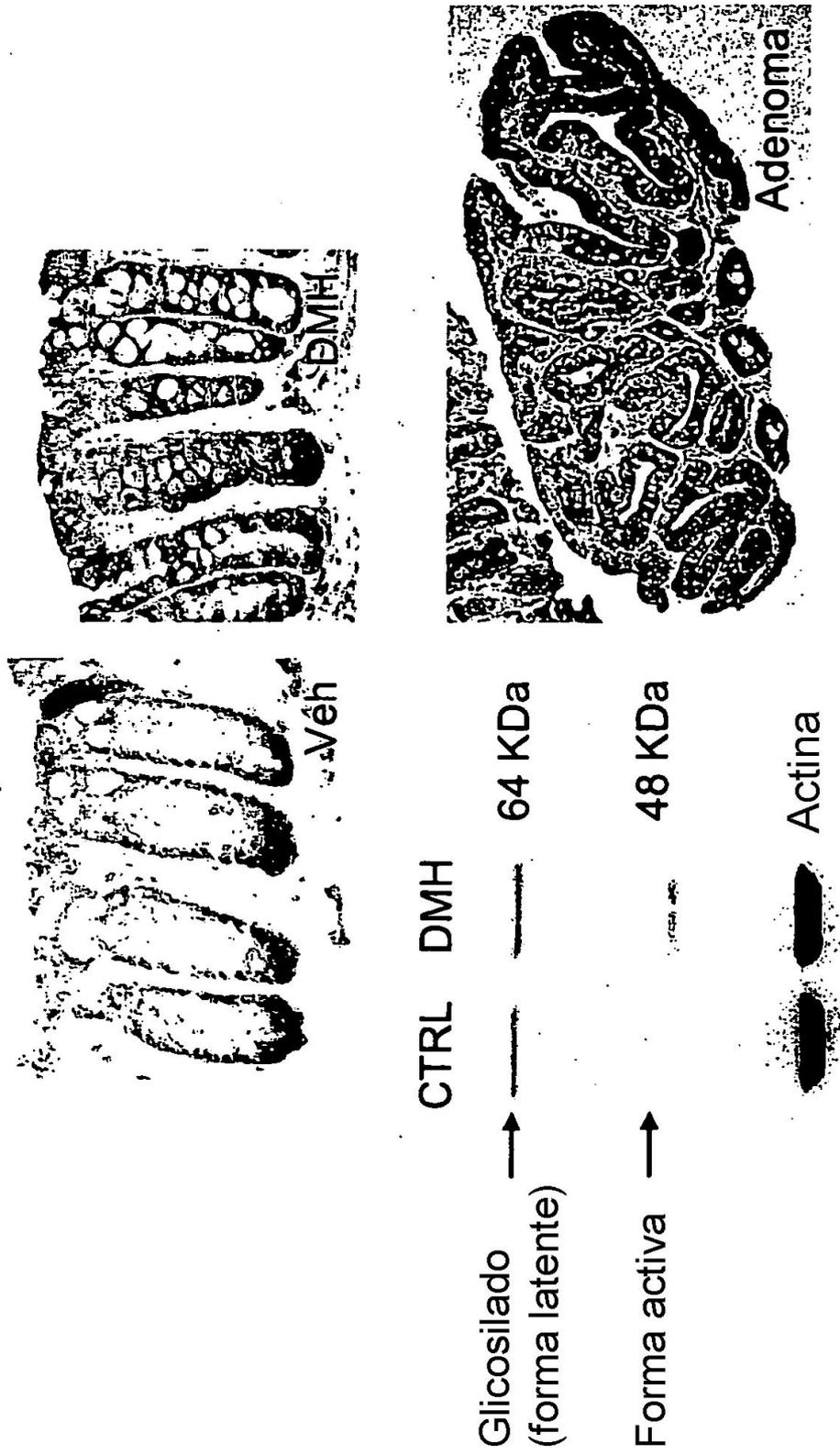


FIG.10

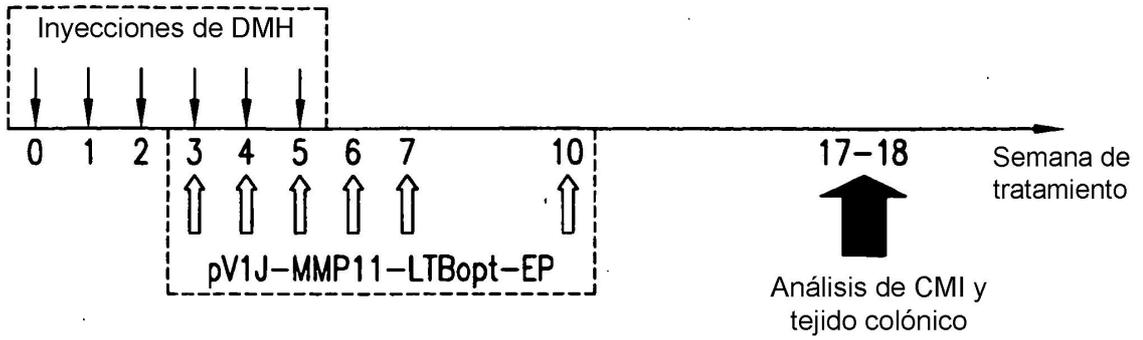


FIG.11A

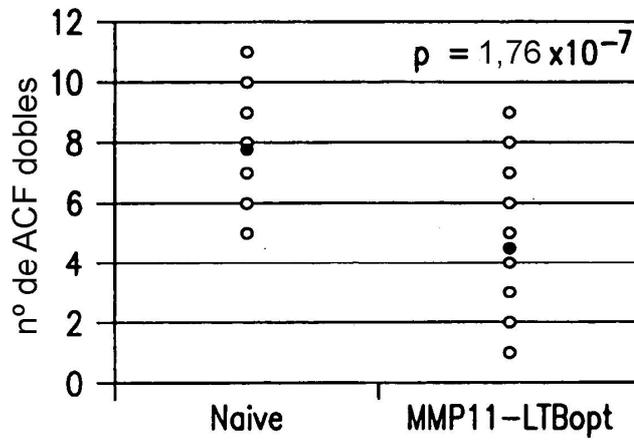


FIG.11B

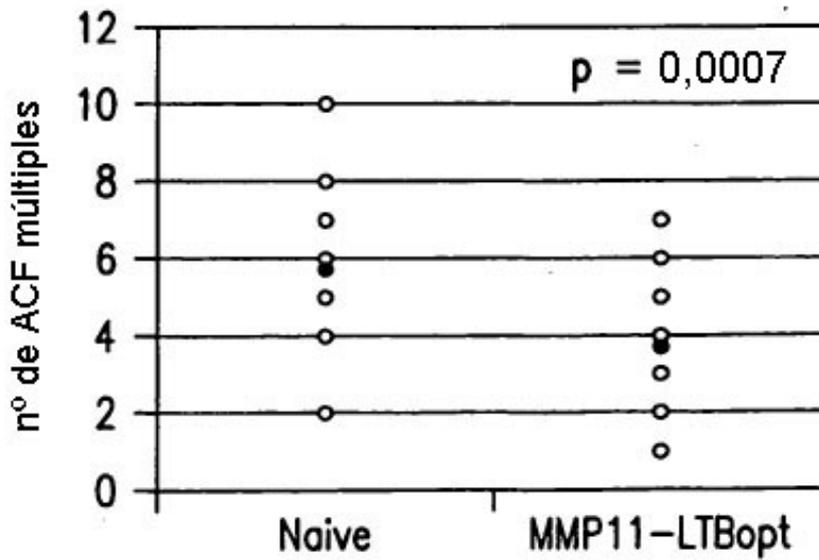


FIG.11C

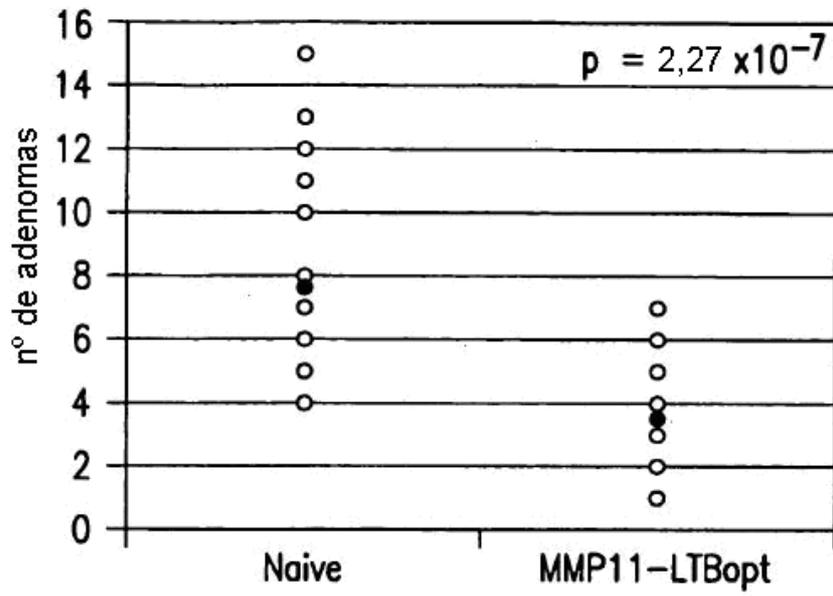


FIG.11D

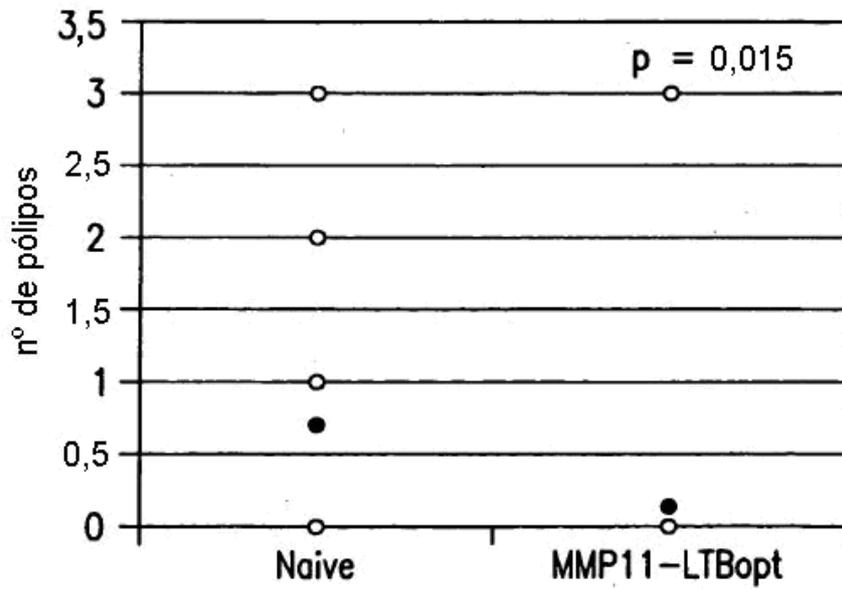


FIG.11E

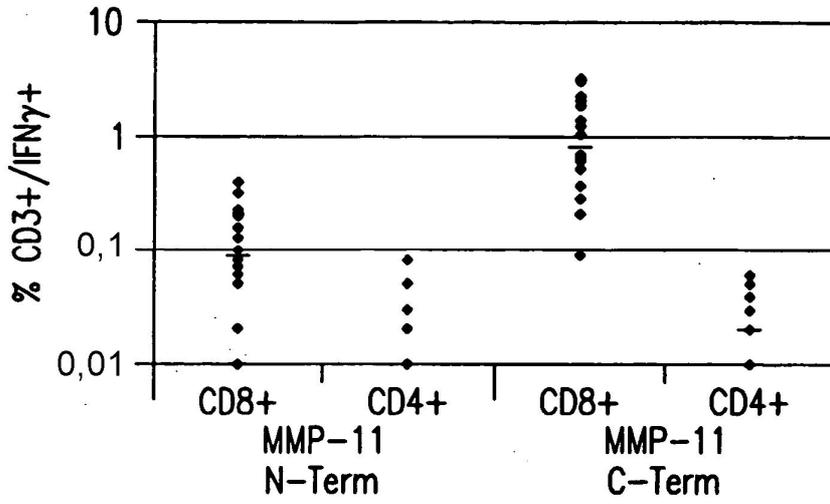


FIG.12A

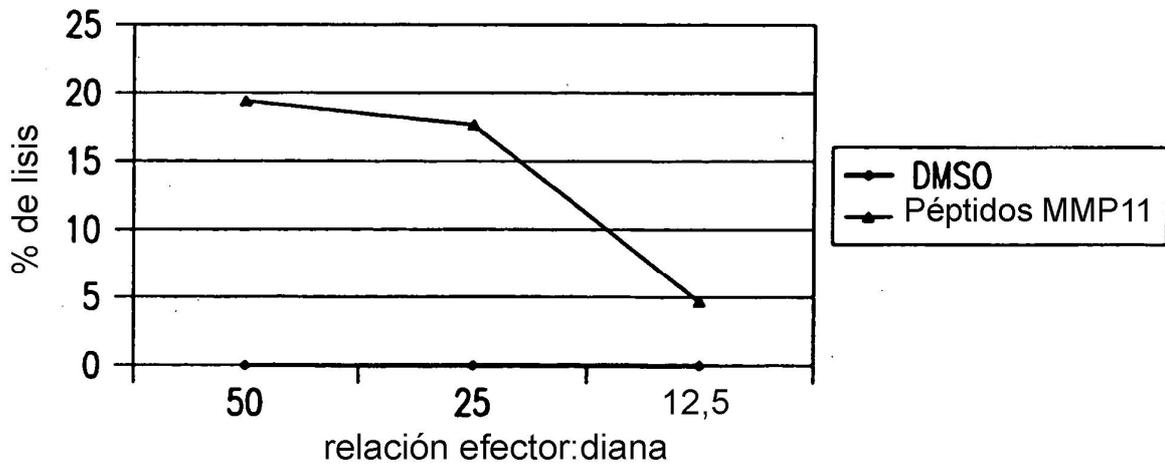


FIG.12B

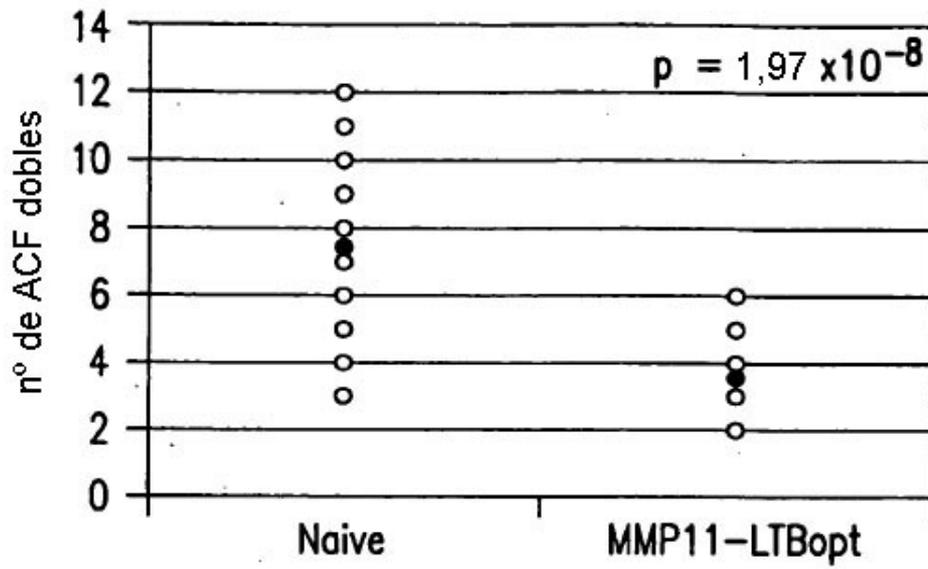


FIG. 13A

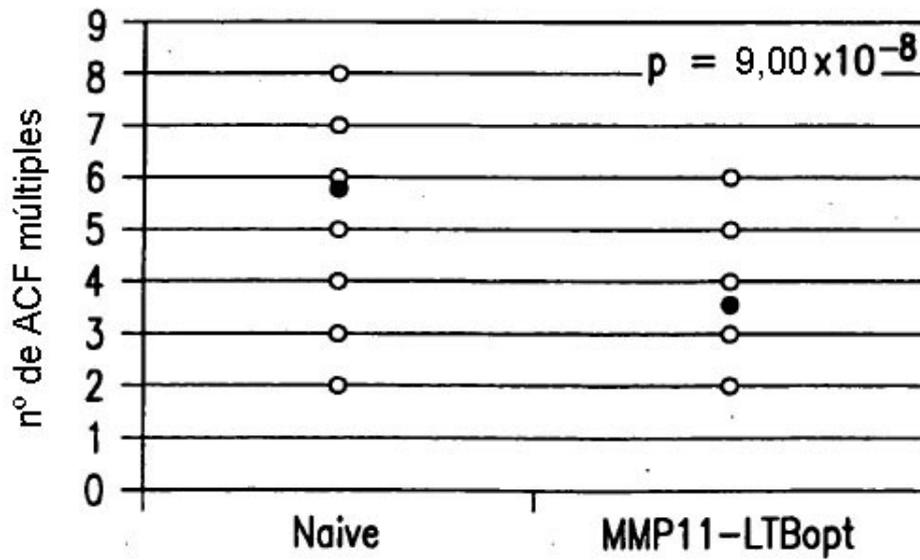


FIG. 13B

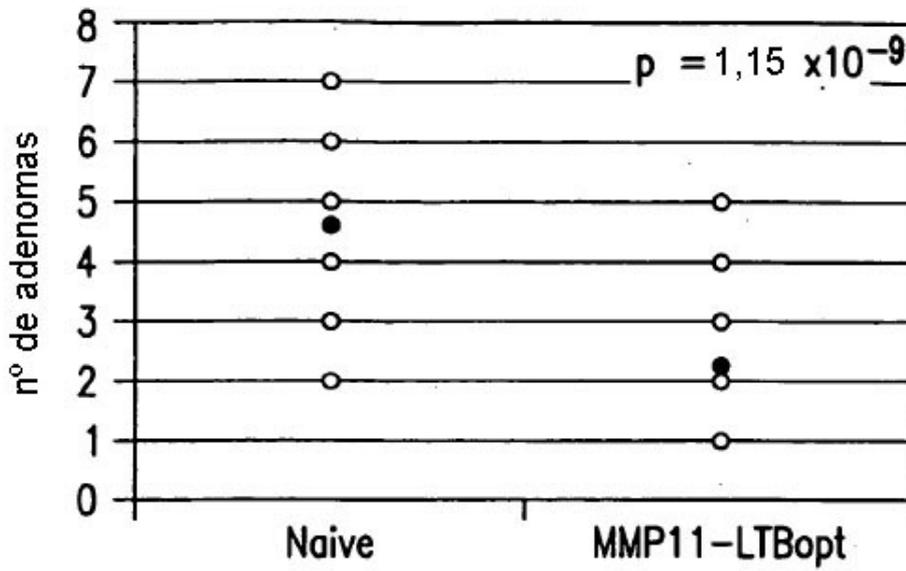


FIG. 13C

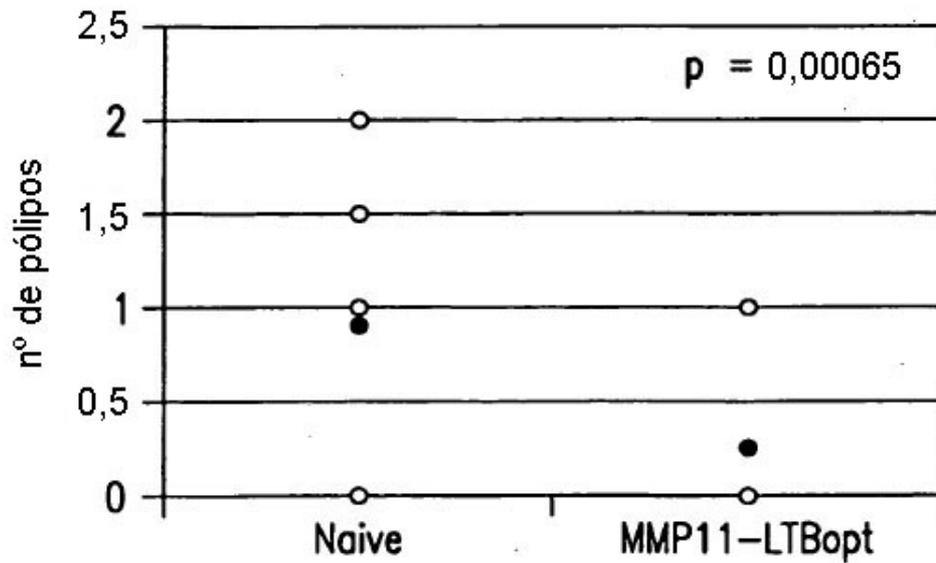


FIG. 13D

1 ATGGCTCCTG CCGCCTGGCT GAGAAGCGCT GCCGCTAGAG CCCTGCTGCC
 CCCTATGCTG CTGCTCCTGC TGCAGCCTCC TCCTCTGCTG GCTCGGGCTC
 101 TGCCTCCTGA CGTGCACCAC CTGCATGCCG AGAGGAGGGG GCCACAGCCC
 TGGCATGCTG CCCTGCCCAG TAGCCCTGCT CCTGCCCTG CCACACAGGA
 201 AGCCCCCAGA CCTGCCAGCA GCCTGAGGCC TCCCAGATGT GGCCTGCCCG
 ACCCATCTGA TGGGCTGAGT GCCCGCAACC GGCAGAAGAG ATTCGTGCTG
 301 TCTGGCGGAC GCTGGGAGAA AACCGACCTG ACCTACAGGA TCCTGCGGTT
 CCCATGGCAG CTGGTGCAGG AACAGGTGCG GCAGACAATG GCTGAGGCCC
 401 TCAAAGTGTG GAGCGATGTG ACCCCACTGA CCTTTACTGA AGTGCACGAG
 GGCAGGGCTG ACATCATGAT CGACTTCGCC CGGTACTGCC ATGGGGACGA
 501 CCTGCCTTTT GATGGGCCTG GGGGCATCCT GGCCCATGCC TTCTTCCCA
 AAACCTACCG GGAAGGGGAT GTGCACTTCG ACTATGATGA GACCTGGACT
 601 ATCGGGGATG ACCAGGGCAC AGACCTGCTG CAGGTGGCCG CCCATGTGTT
 TGGCCACGTG CTGGGGCTGC AGCACACAAC AGCTGCCAAG GCCCTGATGT
 701 CCGCCTTCTA CACCTTTCGC TACCCACTGA GTCTGAGCCC AGATGACTGC
 AGGGGCGTGC AGCACCTGTA TGGCCAGCCC TGGCCCACTG TGACCTCCAG
 801 GACCCAGCC CTGGGCCCCC AGGCTGGGAT TGACACCAAT GAGATTGCC
 CCCTGGAGCC AGACGCCCT CCAGATGCCT GTGAGGCCTC CTTTGACGCC
 901 GTGTCCACCA TCAGAGGCGA GCTGTTTTTC TTCAAGGCCG GCTTTGTGTG
 GAGACTGAGA GGGGGCCAGC TGCAGCCCGG CTACCCAGCT CTGGCCTCTC
 1001 GCCACTGGCA GGGACTGCCC AGCCCTGTGG ACGCTGCCTT CGAGGATGCC
 CAGGGCCACA TTTGGTTCTT CCAGGGCGCT CAGTACTGGG TGTACGACGG
 1101 CGAAAAGCCA GTGCTGGGCC CTGCTCCCCT GACCGAGCTG GGCCTGGTGA
 GATTCCCAGT GCATGCCGCC CTGGTGTGGG GACCCGAGAA GAACAAAATC
 1201 TACTTCTTCC GGGGCAGGGA CTA CTGGAGA TTCCACCCCA GCACCCGGAG
 AGTGGACAGT CCCGTGCCCA GAAGGGCCAC TGA CTGGAGA GGAGTGCCCT
 1301 CTGAGATCGA CGCCGCCTTC CAGGACGCTG ATGGCTATGC CTA CTCTCTG
 CGCGGCAGGC TGTACTGGAA GTTTGACCCT GTGAAAGTGA AGGCTCTGGA
 1401 AGGCTTCCCC AGACTGGTGG GCCCTGACTT CTTTGGCTGT GCCGAGCCTG
 CCAACACTTT CCTGTGATAA

FIG. 14

1 MAPAAWLRSA AARALLPPML LLLLQPPPLL ARALPPDVHH LHAERRGPQP
51 WHAALPSSPA PAPTQEAPR PASSLRPPRC GVPDPSDGLS ARNRQKRFVL
101 SGRWEKTDL TYRILRFPWQ LVQEQVRQTM AEALKVWSDV TPLTFTEVHE
151 GRADIMIDFA RYWHGDDLPF DGPGGILAHA FFPKTHREGD VHF DYDE TWT
201 IGDDQGTDLL QVAAHVFGHV LGLQHHTAAK ALMSAFYTFR YPLSLSPDDC
251 RGVQHLYGQP WPTVTSRTPA LGPQAGIDTN EIAPLEPDAP PDACEASFDA
301 VSTIRGELFF FKAGFVWRLR GGQLQPGYPA LASRHWQGLP SPVDAAFEDA
351 QGHIWFFQGA QYWWYDGEKP VLGPAPLTEL GLVRFVHAA LVMGPEKNKI
401 YFFRGRDYWR FHPSTRRVDS PVPRRATDWR GVPSEIDAAF QDADGYAYFL
451 RGRLYWK FDP VKVKALEGFP RLVGP DFFGC AEPANTFL

FIG. 15

ATGGCTCCTGCCGCCCTGGCTGAGAAGCGCTGCCGCTAGAGCCCTGCTGCCCCCTAT
 GCTGCTGCTCCTGCTGCAGCCTCCTCCTCTGCTGGCTCGGGCTCTGCCTCCTGACG
 TGCACCACCTGCATGCCGAGAGGAGGGGGCCACAGCCCTGGCATGCTGCCCTGCC
 AGTAGCCCTGCTCCTGCCCTGCCACACAGGAAGCCCCAGACCTGCCAGCAGCCT
 GAGGCCTCCCAGATGTGGCGTGCCCGACCCATCTGATGGGCTGAGTGCCCGCAACC
 GGCAGAAGAGATTCGTGCTGTCTGGCGGACGCTGGGAGAAAACCGACCTGACCTAC
 AGGATCCTGCGGTTCCCATGGCAGCTGGTGCAGGAACAGGTGCGGCAGACAATGGC
 TGAGGCCCTGAAAGTGTGGAGCGATGTGACCCCACTGACCTTACTGAAGTGCACG
 AGGGCAGGGCTGACATCATGATCGACTTCGCCCGTACTGGCATGGGGACGACCTG
 CCTTTTGATGGGCCTGGGGGCATCCTGGCCCATGCCTTCTTCCCCAAAACCTACCG
 GGAAGGGGATGTGCACTTCGACTATGATGAGACCTGGACTATCGGGGATGACCAGG
 GCACAGACCTGCTGCAGGTGGCCGCCCATGTGTTGGCCACGTGCTGGGGCTGCAG
 CACACAACAGCTGCCAAGGCCCTGATGTCCGCCCTTCTACACCTTTCGCTACCCACT
 GAGTCTGAGCCCAGATGACTGCAGGGGGCTGCAGCACCTGTATGGCCAGCCCTGGC
 CCACTGTGACCTCCAGGACCCAGCCCTGGGCCCCAGGCTGGGATTGACACCAAT
 GAGATTGCCCCCTGGAGCCAGACGCCCTCCAGATGCCTGTGAGGCCCTCCTTTGA
 CGCCGTGTCCACCATCAGAGGCGAGCTGTTTTCTTCAAGGCCGGCTTTGTGTGGA
 GACTGAGAGGGGGCCAGCTGCAGCCGGCTACCCAGCTCTGGCCTCTGCCACTGG
 CAGGGACTGCCAGCCCTGTGGACGCTGCCTTCGAGGATGCCAGGGCCACATTTG
 GTTCTCCAGGGCGCTCAGTACTGGGTGTACGACGGCGAAAAGCCAGTGCTGGGCC
 CTGCTCCCCTGACCGAGCTGGGCCTGGTGAGATCCCAGTGCATGCCGCCCTGGTG
 TGGGACCCGAGAAGAACAATACTACTTCTTCCGGGGCAGGGACTACTGGAGATT
 CCACCCCAGCACCCGGAGAGTGGACAGTCCCGTGCCAGAAGGGCCACTGACTGGA
 GAGGAGTGCCCTCTGAGATCGACGCCCTTCCAGGACGCTGATGGCTATGCCAC
 TTCCTGCGCGCAGGCTGTACTGGAAGTTGACCCGTGAAAGTGAAGGCTCTGGA
 AGGCTTCCCAGACTGGTGGGCCCTGACTTCTTTGGCTGTGCCGAGCCTGCCAACA
 CTTTCTGTCTAGAgccccccagagcatcaccgagctgtgcagcagataccggaac
 Acccagatttacaccatcaacgacaagatcctgagctacaccgagagcatggccgg
 Caagagggagatggtgatcatcaccttcaagagcggcggccaccttccaggtggagg
 Tgcccggcagccagccatcgacagccagaogaaggccatcgagcggatgaaggac
 Accctgaggatcacctacctcaccgagaccaagatcgacaagctgtgcgtgtggaa
 caacaagaccccccaacagcatcgccgccatcagcatggagaattgataa

FIG. 16

MAPAAWLRSA AARALLPPML LLLLQPPPLL ARALPPDVHH LHAERRGPQP
 WHAALPSSPA PAPTQEAPR PASSLRPPRC GVPDPSDGLS ARNRQKRFVL
 SGRWEKTDL TYRILRFPWQ LVQEQVRQTM AEALKWSDV TPLTFTEVHE
 GRADIMIDFA RYWHGDDLPF DPGGILAHA FFPKTHREGD VHF DYDETWT
 IGDDQGTDL QVAHVFGHV LGLQHTTAAK ALMSAFYFTR YPLSLSPDDC
 RGVQHLYGQP WPTVTSRTPA LGPQAGIDTN EIAPLEPDAP PDACEASFDA
 VSTIRGELFF FKAGFVWRLR GGQLQPGYPA LASRHWQGLP SPVDAAFEDA
 QGHIWFFQGA QYWVDGEKP VLGPAPLTEL GLVRFVHAA LVWGPEKNKI
 YFFRGRDYWR FHPSTRRVDS PVPRRATDWR GVPSEIDAAF QDADGYAYFL
 RGRLYWKFDV VKVKALEGFP RLVGPDFFGC AEPANTFLSR APQSITELCS
 EYRNTQIYTI NDKILSYTES MAGKREMVII TFKSGATFQV EVPGSQHIDS
 QKKAIERMKD TLRITYLTET KIDKLCVWNN KTPNSIAAIS MEN

FIG. 17

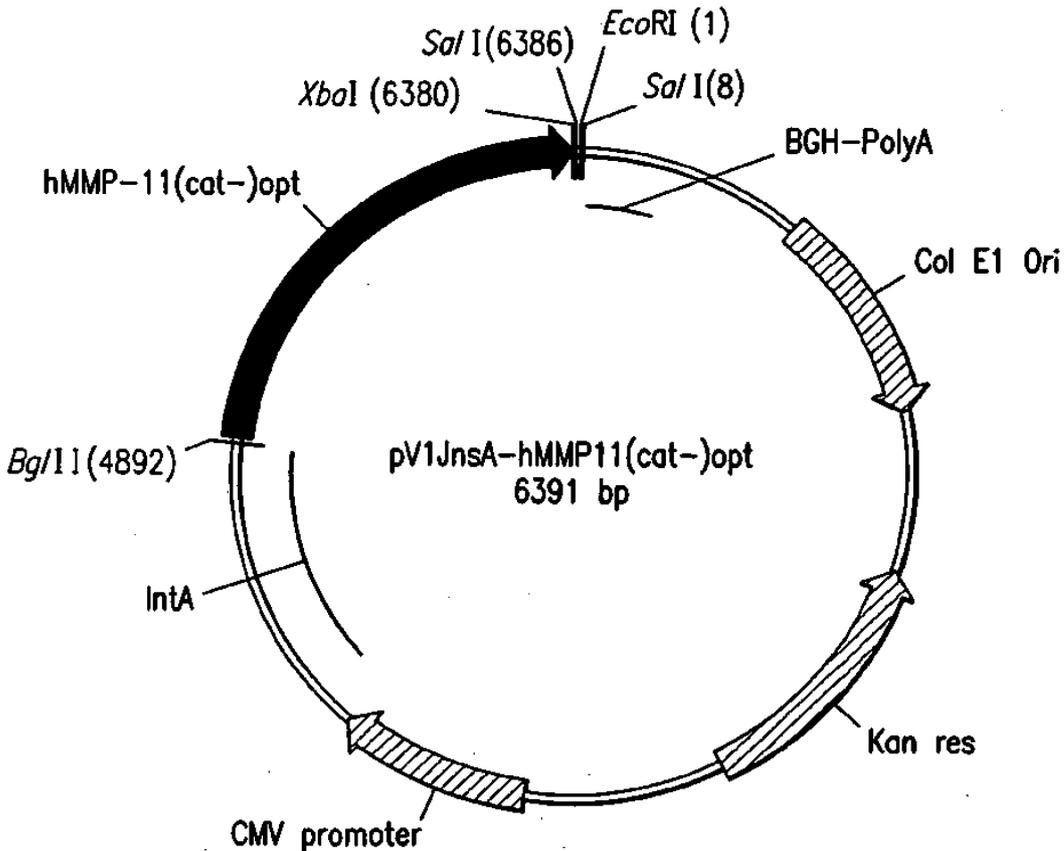


FIG. 18

Efecto de la DMH en un esquema de inmunización de 8-11 semanas

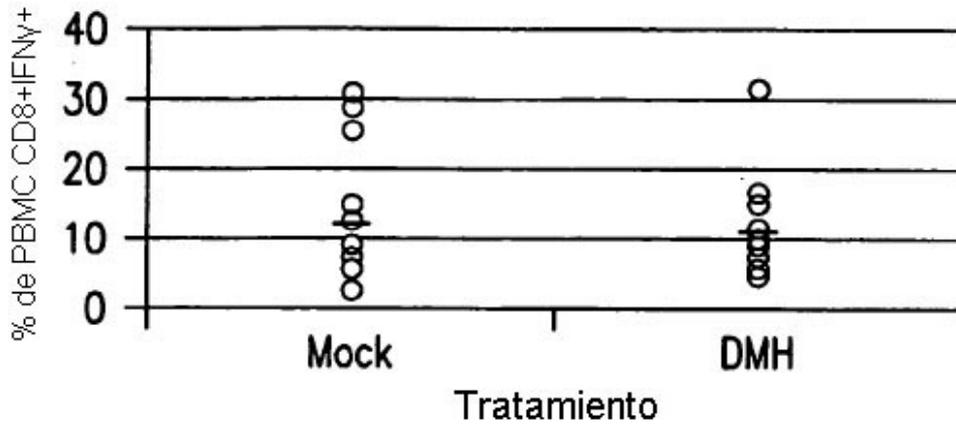


FIG. 19A

Efecto de la DMH en un esquema de inm. de 8-11 semanas: respuesta CD8+

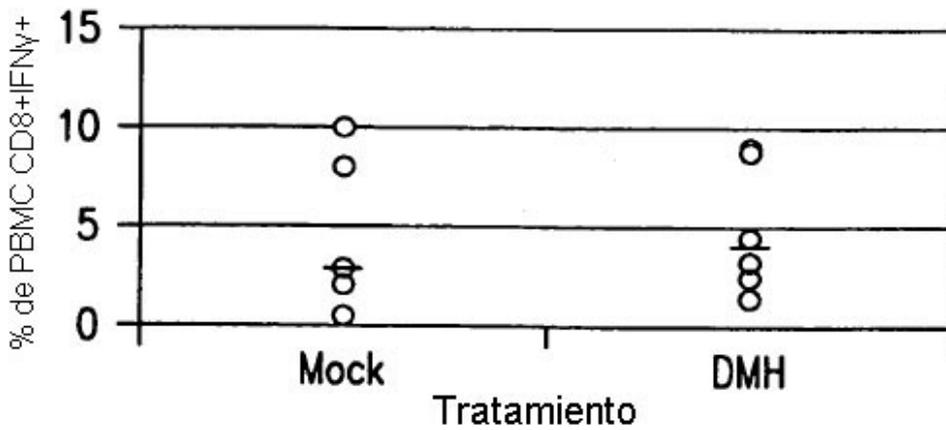


FIG. 19B

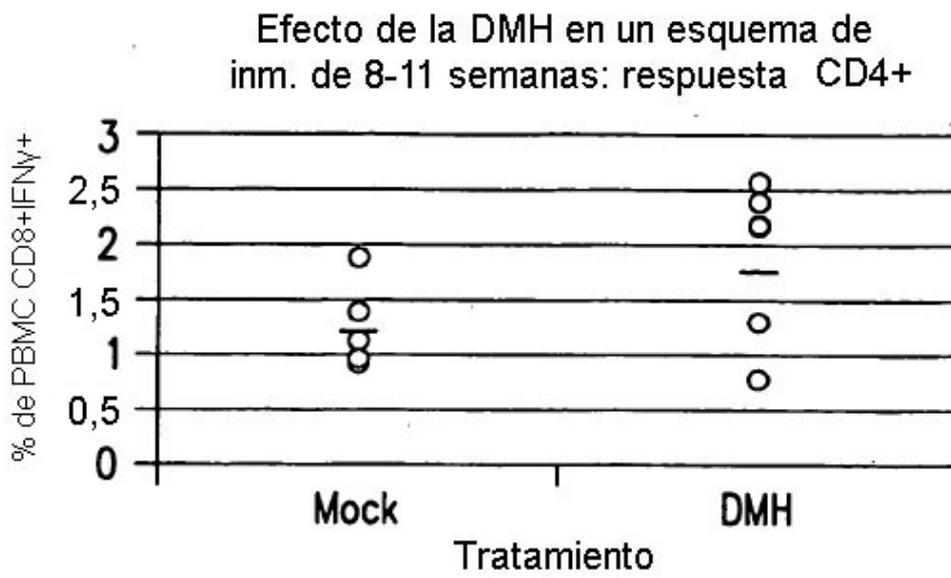


FIG. 19C

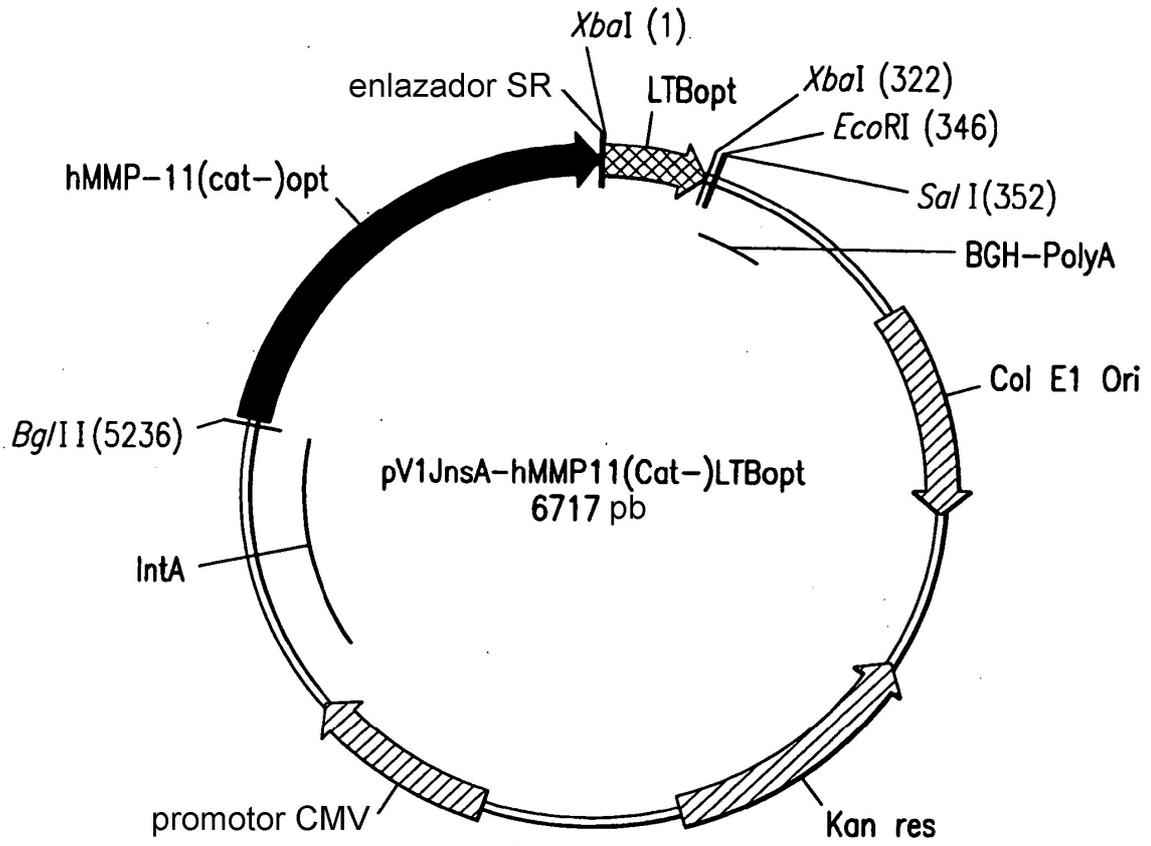


FIG.20