

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 812**

51 Int. Cl.:

C07K 14/285 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08701434 .6**

96 Fecha de presentación: **11.01.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2114993**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

54 Título: **Vacuna**

30 Prioridad:

15.01.2007 GB 0700760
23.01.2007 GB 0701262

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

28.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

28.12.2012

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:

BLAIS, NORMAND;
MARTIN, DENIS y
PALMANTIER, REMI M.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 812 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

- 5 La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden un antígeno derivado del así llamado antígeno PRAME de rechazo a tumores (también conocido como DAGE) unido a una pareja de fusión inmunológica derivada de proteína D de *Haemophilus influenzae* B, procedimientos para preparar las mismas y para formular vacunas y usar las mismas para tratar un intervalo de cánceres, que incluyen, pero no se limitan a melanoma, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón tal como NSCLC, sarcoma, cáncer ovárico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, carcinoma colorrectal, mieloma múltiple, leucemia que incluye leucemia aguda y carcinoma esofágico.
- 10 Entre los diferentes grupos de antígenos asociados a tumores, los antígenos del cáncer de testículo son de interés para inmunoterapia debido a su expresión específica de tumores amplia y al hecho de que generalmente estos antígenos no se expresan en células sanas. Se han descrito tantos como más de 50 antígenos de cáncer de testículo y, para muchos de ellos, se han identificado epítopes reconocidos por linfocitos T. PRAME es un antígeno de cáncer de testículo y está bajo investigación como una inmunoterapia potencial.
- 15 En inmunoterapia el antígeno de cáncer se introduce al paciente usualmente como una vacuna, por ejemplo que contiene un antígeno como una proteína o un fragmento inmunógeno de la misma, o como ADN que codifica para la proteína o como un vector que contiene dicho ADN, que estimula el sistema inmunitario del paciente para atacar tumores que expresan el mismo antígeno.
- 20 Si se estimula la respuesta apropiada, los linfocitos T (células T) atacan antígenos directamente, y proporcionan control de la respuesta inmune. Se desarrollan células B y células T que son específicas para un tipo de antígeno. Cuando el sistema inmune se expone a un antígeno diferente, se forman células B diferentes y células T diferentes. Según se desarrollan los linfocitos, aprenden normalmente a reconocer los tejidos propios del cuerpo (propios) como diferentes de los tejidos y partículas no encontrados normalmente en el cuerpo (no propios). Una vez se forman las células B y las células T, unas pocas de esas células se multiplicarán y proporcionarán "memoria" para el sistema
- 25 inmune. Esto permite al sistema inmune responder más rápido y más eficientemente la vez siguiente que se exponga al mismo antígeno. Ciertos experimentos parecen indicar que los antígenos de cáncer de testículo pueden estimular mecanismos de memoria en el sistema inmune
- 30 Se teoriza por algunos que PRAME está implicado en muerte celular o ciclos celulares. Se ha mostrado por algunos grupos que se expresa en melanoma y una amplia diversidad de tumores que incluyen de pulmón, de riñón, y de cabeza y cuello. De forma interesante también parecen expresarse en el 40-60% de leucemias tal como leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda, véase por ejemplo Exp. Hematol. diciembre de 2000; 28(12):1413-22. En pacientes se ha observado que la sobreexpresión de PRAME parece estar asociada con supervivencia más alta y tasas menores de recaída en comparación con aquellos quienes no sobreexpresan la proteína.
- 35 El antígeno y su preparación se describen en la Patente de los Estados Unidos N.º: 5.830.753. PRAME se encuentra en la Base de Datos de Genes Humanos Comentada H-Inv DB bajo los números de acceso: U65011.1, BC022008.1, AK129783.1, BC014974.2, CR608334.1, AF025440.1, CR591755.1, BC039731.1, CR623010.1, CR611321.1, CR618501.1, CR604772.1, CR456549.1, y CR620272.1.
- 40 La proteína D es una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa, *Haemophilus influenzae* B. La información sobre las parejas de fusión inmunológicas derivadas de proteína D se puede obtener a partir del documento WO 91/18926.
- 45 Las proteínas de fusión de una parte de un antígeno y una pareja de fusión heteróloga se preparan algunas veces para incrementar la inmunogenicidad del antígeno y/o para ayudar a la producción de la proteína en cantidades y/o pureza apropiadas, véase por ejemplo el documento WO 99/40188 que describe una proteína de fusión de MAGE y, por ejemplo proteína D una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa, *Haemophilus influenzae* B. La proteína de fusión se prepara recombinantemente y la secuencia de secreción de proteína D se puede incorporar dentro de la proteína de fusión para potencialmente ayudar a la secreción y solubilización del producto final.
- 50 El documento WO00/50077 describe un número de péptidos inmunogénicos unido a un vehículo, en el que el vehículo se deriva de *Haemophilus influenzae* proteína D o fragmentos de la misma. El documento WO99/10375 describe proteínas de fusión del Virus del Papiloma Humano (VPH), unidas a una pareja de fusión inmunológica que proporciona epítopes de células T auxiliares al antígeno de VPH

Breve Descripción de las Figuras y Constructos/Secuencias

Figura 1	Análisis por SDS-page de Constructos 3 y 4
Figura 2	Análisis por SDS-page de Constructos 3a y 4a
Figura 3	Respuesta de CD4 (coadyuvante AS01B)
Figura 4	Respuesta de CD8 (coadyuvante AS01B - 20070499)
Figura 5	Respuesta de CD4 (coadyuvante AS15)
Figura 6	Respuesta de CD8 (coadyuvante AS15)

(continuación)

Figura 7	Una secuencia aminoacídica destacada de ejemplos de constructos de la presente invención
Figura 8	Alineación entre LipoD-MAGE3-His (SEC ID N.º: 43) y pD1/3-PRAME-His (SEC ID N.º: 10)
Figura 9	Alineación entre la secuencia compartida de la proteína D original de <i>Haemophilus influenzae</i> (SEC ID N.º: 45) y la LipoD-MAGE3-His (SEC ID N.º: 43)
Figura 10	Alineación entre la secuencia compartida de la proteína D original de <i>Haemophilus influenzae</i> (SEC ID N.º: 41), la pD-MAGE3-His (SEC ID N.º: 45) y un constructo de pD1/3-PRAME-His, que no incluye los aminoácidos 2-D y 3-P (SEC ID N.º: 44)
Figura 11	Análisis por SDS page de pD1/3-PRAME con o sin señal de secreción (SS) y marca de His (His) en el vector pET21.
Figura 12	Secuencia de proteína D 1/3 MAGE-A3-His (SEC ID N.º: 44)
Constructo 1 (Ejemplo 1)	MDP- 20-127 - Proteína D – PRAME – TSGHHHHHH (plásmido TCMP14) (secuencia de nucleótidos SEC ID N.º: 1; secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 2)
Constructo 2 (Ejemplo 2)	MDP- 20-127 - Proteína D – PRAME – sin marca de His (plásmido TCMP14) (secuencia de nucleótidos SEC ID N.º: 3; secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 4)
Constructo 3 (Ejemplo 3)	MDP- 20-127 - Proteína D – PRAME – LEHHHHHH (plásmido pET21) (secuencia de nucleótidos SEC ID N.º: 5; secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 6)
Constructo 4 (Ejemplo 4)	MDP- 20-127 - Proteína D – PRAME – sin marca de His (plásmido pET21) (secuencia de nucleótidos SEC ID N.º: 7; secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 8)
Constructo 3a (Ejemplo 3a)	MDP- 20-127 - Proteína D – PRAME – HHHHHHH (plásmido pET26) (secuencia de nucleótidos SEC ID N.º: 9; secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 10)
Constructo 4a (Ejemplo 4a)	MDP- 20-127 - Proteína D – PRAME – sin marca de His (plásmido pET26) (secuencia de nucleótidos SEC ID N.º: 11; secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 12)
Secuencia 1 (SEC ID N.º: 1)	es la secuencia de ADN para el ejemplo 1
Secuencia 2 (SEC ID N.º: 2)	es la secuencia de aminoácidos para el ejemplo 1
Secuencia 3 (SEC ID N.º: 3)	es la secuencia de ADN para el ejemplo 2
Secuencia 4 (SEC ID N.º: 4)	es la secuencia de aminoácidos para el ejemplo 2
Secuencia 5 (SEC ID N.º: 5)	es la secuencia de ADN para el ejemplo 3
Secuencia 6 (SEC ID N.º: 6)	es la secuencia de aminoácidos para el ejemplo 3
Secuencia 7 (SEC ID N.º: 7)	es la secuencia de ADN para el ejemplo 4
Secuencia 8 (SEC ID N.º: 8)	es la secuencia de aminoácidos para el ejemplo 4

(continuación)

Secuencia 9 (SEC ID N.º: 9)	es la secuencia de ADN de codón optimizado para el ejemplo 3a
Secuencia 10 (SEC ID N.º: 10)	es la secuencia de aminoácidos para el ejemplo 3a
Secuencia 11 (SEC ID N.º: 11)	es la secuencia de ADN de codón optimizado para el ejemplo 4a
Secuencia 12 (SEC ID N.º: 12)	es la secuencia de aminoácidos para el ejemplo 4a
SEC ID N.º: 13	VLDGLDVLL (PRA ¹⁰⁰⁻¹⁰⁶)
SEC ID N.º: 14	SLYSFPEPEA (PRA ¹⁴²⁻¹⁵¹)
SEC ID N.º: 15	ALYVDSLFFL (PRA ³⁰⁰⁻³⁰⁹)
SEC ID N.º: 16	LYVDSLFFL (PRA ³⁰¹⁻³⁰⁹)
SEC ID N.º: 17	SLLQHLIGL (PRA ⁴²⁹⁻⁴³³)
SEC ID N.º: 18 a 35	Oligonucleótidos usados en los ejemplos de la presente invención
SEC ID N.º: 36	TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826);
SEC ID N.º: 37	TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
SEC ID N.º: 38	ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
SEC ID N.º: 39	TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
SEC ID N.º: 40	TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)
SEC ID N.º: 41	Los aminoácidos 1 a 127 de la Proteína D de <i>Haemophilus influenzae</i>
SEC ID N.º: 42	Aminoácidos 1-Met; 2-Asp; 3-Pro; seguidos por los aminoácidos 20 a 127 de proteína D
SEC ID N.º: 43	Secuencia de aminoácidos de Proteína D 1/3-MAGE-A3-His
SEC ID N.º: 44	Aminoácidos de proteína D de <i>Haemophilus influenzae</i> para usar en una secuencia pD1/3-PRAME-His
SEC ID N.º: 45	Aminoácidos de proteína D de <i>Haemophilus influenzae</i> para usar en una secuencia pD1/3-MAGE-His

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende:

- 5 a) PRAME;
b) Una pareja de fusión heteróloga derivada de proteína D,

en la que la proteína de fusión comprende los aminoácidos 20 a 127 de proteína D; y c) adicionalmente aminoácidos Met-Asp-Pro en el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína de fusión, en la que la proteína de pareja de fusión heteróloga derivada de la proteína O (b) se funde con el N-terminal de PRAME.

- 10 Parece que para las proteínas de fusión que comprenden PRAME o un fragmento inmunogénico del mismo y proteína D, o para proteínas de fusión que comprenden proteína D, o para una proteína pareja de fusión que comprende proteína D, que la presencia de la secuencia de secreción (o secuencia señal) puede afectar detrimentalmente la cantidad de proteína de fusión producida.

PRAME

- 15 En un aspecto la proteína de fusión de la presente invención comprende una proteína pareja de fusión como se

describe en el presente documento y un antígeno PRAME o fragmento inmunogénico del mismo. Generalmente la proteína PRAME tiene 509 aminoácidos y en una realización se pueden usar todos los 509 aminoácidos de PRAME. Se han identificado varios epítopes de linfocitos T citotóxicos (CTL) en PRAME, por ejemplo:

- 5 VLDGLDVLL (PRA¹⁰⁰⁻¹⁰⁸; SEC ID N.º: 13);
 SLYSFPEPEA (PRA¹⁴²⁻¹⁵¹; SEC ID N.º: 14);
 ALYVDSLFFL (PRA³⁰⁰⁻³⁰⁹; SEC ID N.º: 15);
 LYVDSLFFL (PRA³⁰¹⁻³⁰⁹; SEC ID N.º: 16) y
 SLLQHLIGL (PRA⁴²⁵⁻⁴³³; SEC ID N.º:17).

10 Generalmente es deseable incluir tantos de estos epítopes como sea posible dentro del antígeno para generar una respuesta inmune fuerte y asegurar que el antígeno es tan inmunogénico como sea posible. Aunque, puede ser posible compensar una menor inmunogenicidad de un constructo dado empleando una formulación con un coadyuvante inmunológico potente. Los coadyuvantes fuertes se discuten más adelante en mayor detalle.

En un aspecto la invención proporciona la parte de PRAME de la proteína de fusión que comprende, está constituida o consiste esencialmente en la proteína de longitud total.

15 Sin embargo, la invención también se extiende a constructos de PRAME con sustituciones conservadoras. En una realización, pueden estar sustituidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos. El constructo de PRAME como se describe en el presente documento puede contener adicionalmente o alternativamente delecciones o inserciones en la secuencia de aminoácidos cuando se compara con la secuencia de PRAME de tipo salvaje. En una realización, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos se pueden insertar o eliminar.

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

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

- 30 i) Aspartato/asparagina/glutamato/glutamina
 ii) Serina/treonina
 iii) Lisina/arginina
 iv) Fenilalanina/tirosina/triptófano
 v) Leucina/isoleucina/valina/metionina
 vi) Glicina/alanina

35 Generalmente la secuencia de PRAME/los aminoácidos de PRAME usados en las proteínas de fusión de la invención serán más del 80%, tal como el 85, 90, 95 y más específicamente el 99% idénticos al PRAME que se da en la naturaleza. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica son conscientes de que los restos de aminoácidos generados como un resultado del proceso de clonación se pueden mantener en las proteínas sintetizadas recombinantemente. Si éstos no afectan detrimentalmente a las características del producto, es opcional si se eliminan o no.

40 En un aspecto la invención proporciona una proteína de fusión como se describe en el presente documento que comprende, consta de o consiste esencialmente en proteína PRAME de longitud total. En un aspecto adicional la parte de PRAME de la proteína de fusión de la presente invención comprende, está constituida o consiste esencialmente en uno o más de los siguientes epítopes:

- 45 VLDGLDVLL (PRA¹⁰⁰⁻¹⁰⁸; SEC ID N.º: 13);
 SLYSFPEPEA (PRA¹⁴²⁻¹⁵¹; SEC ID N.º: 14);
 ALYVDSLFFL (PRA³⁰⁰⁻³⁰⁹; SEC ID N.º: 15);
 LYVDSLFFL (PRA³⁰¹⁻³⁰⁹; SEC ID N.º: 16) y
 SLLQHLIGL (PRA⁴²⁵⁻⁴³³; SEC ID N.º: 17).

50 Las proteínas de fusión del antígeno PRAME y la proteína pareja de fusión proteína D como se describen en el presente documento pueden estar químicamente conjugadas, pero se expresan preferiblemente como proteínas de fusión recombinantes, que pueden permitir niveles incrementados de proteína PRAME en un sistema de expresión según se compara con PRAME solo sin pareja de fusión, tal como las proteínas proteína D o proteína D modificada.

Las proteínas de fusión de la presente invención, como se describen en el presente documento, pueden comprender adicionalmente una o más secuencias de engarce entre la proteína pareja de fusión y el antígeno tumoral o parte inmunogénica del mismo; o entre la proteína pareja de fusión y una marca de His u otra marca de afinidad (si está presente); o entre el antígeno tumoral o parte inmunogénica del mismo y una marca de His u otra marca de afinidad (si está presente). Los aminoácidos en las secuencias de engarce pueden no estar relacionados con las secuencias del antígeno y/o pareja de fusión.

La pareja de fusión puede ayudar en expresar la proteína (potenciador de expresión) a rendimientos más altos que la proteína recombinante nativa. La proteína pareja de fusión D, debido a su naturaleza foránea, puede ser particularmente inmunogénica *in vivo* y ayudar a la proteína de fusión que comprende PRAME u otro antígeno tumoral proporcionando epítopes T auxiliares, preferiblemente epítopes T auxiliares reconocidos por células T CD4. Se puede creer que tales células T-CD4 contribuyen a generar una respuesta inmune favorable, en particular, una respuesta de células T citotóxicas CD8.

En una realización, la pareja de fusión puede actuar tanto como una pareja que potencia la expresión como en forma de una pareja de fusión inmunológica.

En un aspecto la invención proporciona una proteína de fusión en la que la parte N-terminal de la proteína D (como se describe anteriormente o en el presente documento) se condensa al extremo N-terminal de PRAME. Más específicamente la fusión con el fragmento de la proteína D y el extremo N-terminal de PRAME se lleva a cabo de tal forma que el PRAME reemplaza el fragmento C-terminal de la proteína D que se ha escindido. Así el extremo N-terminal de la proteína D llega a ser el extremo N-terminal de la proteína de fusión.

Las proteínas de fusión de la invención pueden incluir un marcador de afinidad, tal como por ejemplo, una marca de histidina que comprende entre 5 - 9 restos de histidina tal como 6 restos de histidina. Estos restos pueden, por ejemplo estar en la parte terminal de la proteína D (tal como en la parte terminal de la proteína D) y/o pueden estar condensados a la parte terminal del antígeno PRAME o derivado del mismo, o al antígeno tumoral o al derivado del mismo como se describen en el presente documento. Generalmente sin embargo la marca de histidina puede localizarse en la parte terminal del antígeno PRAME o derivado del mismo, o el antígeno tumoral o derivado del mismo como se describe en el presente documento tal como el extremo C-terminal del antígeno PRAME o derivado del mismo, o el antígeno tumoral o derivado del mismo como se describe en el presente documento. Las marcas de histidina pueden ser ventajosas a la hora de ayudar en la purificación.

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

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

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

El proceso de la invención se puede llevar a cabo mediante técnicas recombinantes convencionales tales como las descritas en Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, 1982-1989.

En particular, el proceso puede comprender las etapas de:

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

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

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

Los vectores de expresión replicables se pueden preparar de acuerdo con la invención, escindiendo un vector compatible con la célula huésped para proporcionar un segmento lineal de ADN que tiene un replicón intacto, y combinando dicho segmento lineal con una o más moléculas de ADN que, conjuntamente con dicho segmento lineal codifican el producto deseado, tal como el polímero de ADN que codifica la proteína de la invención, o derivado de la misma, bajo condiciones de ligado.

Así, el polímero de ADN se puede preformar o formar durante la construcción del vector, según se desee.

La elección del vector se determinará en parte mediante la célula huésped, que puede ser procarionta o eucariota pero son generalmente células de *E. coli* o células CHO. Los vectores adecuados pueden incluir plásmidos por ejemplo TMCP14 o pET21 o pET26, pcDNA3, bacteriófagos, cósmidos y virus recombinantes.

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

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

La elección de condiciones de transformación se determina por la célula huésped. Así, un huésped bacteriano tal como *E. coli* se puede tratar con una solución de CaCl₂ (Cohen y *col.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, 69, 2110) o con una solución que comprende una mezcla de RbCl, MnCl₂, acetato de potasio y glicerol, y después con ácido 3-[N-morfolino]-propano-sulfónico, RbCl y glicerol. Las células de mamífero en cultivo se pueden transformar mediante coprecipitación con calcio del ADN vector sobre las células. La invención también se extiende a una célula huésped transformada con un vector de expresión replicable de la invención.

El ADN puede haber experimentado optimización de codones mediante técnicas estándar para facilitar adicionalmente la expresión del huésped relevante. En una realización de la presente invención se proporciona ADN que codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno PRAME o parte o fragmento del mismo como se describe en el presente documento, en el que la secuencia de nucleótidos del antígeno PRAME o parte o fragmento del mismo tiene los codones optimizados. En una realización, la secuencia de nucleótidos de proteína D no tiene los codones optimizados.

Cultivar la célula huésped transformada bajo condiciones que permiten la expresión del polímero de ADN se lleva a cabo convencionalmente, como se describe en, por ejemplo, Maniatis y *col.* y "DNA Cloning" citados anteriormente. Así, preferiblemente la célula se suministra con nutriente y se cultiva a temperatura por debajo de 50°C.

Las proteínas de la presente invención pueden expresarse en procariontas o eucariotas tales como levadura pero se expresan a menudo en *E. coli*. Se pueden emplear cepas particulares de *E. coli* tales como AR58 y BLR DE3.

Generalmente un marcador de selección de, por ejemplo resistencia a kanamicina o resistencia a ampicilina se incorpora para facilitar identificación de la incorporación exitosa del gen/constructo recombinante dentro del sistema de expresión.

El producto se recupera mediante procedimientos convencionales de acuerdo con la célula huésped y de acuerdo con la localización del producto de expresión (intracelular (intracelular o segregado dentro del medio de cultivo o dentro del periplasma celular). En una realización de la presente invención el producto de expresión es intracelular. En una realización de la presente invención el producto de expresión es una proteína insoluble. Así, la célula huésped es bacteriana, tal como *E. coli* ella puede, por ejemplo, lisarse físicamente, químicamente o enzimáticamente y el producto proteico aislarse del lisado resultante. Cuando la célula huésped es de mamífero, el producto puede generalmente aislarse a partir del medio del nutriente o a partir de extractos libres de células. Las técnicas de aislamiento de proteínas convencionales incluyen precipitación selectiva, cromatografía de adsorción, y cromatografía de afinidad que incluyen una columna de afinidad a anticuerpo monoclonal.

En una realización de la invención se proporciona un proceso para producir una proteína de fusión como se describe en el presente documento que comprende la etapa de expresar en una célula una proteína de fusión que comprende una proteína pareja de fusión como se describe en el presente documento. La célula puede ser una bacteria. En una realización en la que la célula es una bacteria, la bacteria puede ser *E. coli*. El procedimiento de la presente invención puede comprender la etapa de expresar una proteína de fusión como se describe en el presente documento en una célula como una proteína insoluble. El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de lisar la célula y purificar la proteína de fusión expresada a partir de las células lisadas.

En una realización de la invención se proporciona una proteína de fusión obtenida mediante u obtenible mediante un procedimiento o proceso descrito en el presente documento.

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

Se espera generalmente que cada dosis humana comprenderá 1 a 1000 µg de proteína, y preferiblemente 30 - 300 µg.

- 5 La presente invención también proporciona composición farmacéutica tal como vacuna que comprende una proteína de fusión de la presente invención en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 La vacuna puede contener opcionalmente uno o más antígenos o polipéptidos asociados a tumores distintos, o preferiblemente puede combinarse con otras vacunas de cáncer basadas en un antígeno asociado a tumores. Por ejemplo, estos antígenos asociados a tumores podrían ser antígenos como los que se describen en el presente documento y/o pueden ser miembros que pertenecen a las familias MAGE, LAGE y GAGE o WT-1. En una realización el antígeno asociado a tumor puede comprender o estar constituido por el antígeno MAGE-A3.

La preparación de vacuna se describe generalmente en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M.F. & Newman M.J). (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton, Patente de los Estados Unidos 4.235.877.

15 Las proteínas de la presente invención pueden estar preferiblemente coadyuvadas en la formulación de vacunas de la invención. Los coadyuvantes adecuados pueden incluir una sal de aluminio tal como un gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero pueden ser también una sal de calcio, hierro o cinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos catiónicamente o aniónicamente derivatizados, o polifosfacenos. Otros coadyuvantes conocidos incluyen oligonucleótidos que contienen CpG. Los oligonucleótidos se caracterizan en que el dinucleótido CpG está no metilado. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen en, por ejemplo el documento WO 96/02555.

20 En la formulación de las invenciones puede ser deseable que la composición coadyuvante induzca una respuesta inmune preferencialmente del tipo TH1. En una realización hay proporcionado un sistema coadyuvante que incluye, por ejemplo una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL) conjuntamente con una sal de aluminio. El coadyuvante puede incluir opcionalmente también oligonucleótidos CpG para inducir preferencialmente una respuesta TH1.

25 Un sistema potenciado que se puede usar en la presente invención comprende la combinación de un lípido A monofosforilo y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en el documento WO 94/00153, o, por ejemplo una composición menos reactógena donde el QS21 se desactiva con colesterol como se describe en el documento WO 96/33739.

Una formulación que se puede usar en formulaciones de la presente invención, que comprende QS21 3D-MPL y tocoferol, por ejemplo en una emulsión de aceite en agua, se describe en el documento WO 95/17210.

35 Otra formulación coadyuvante que se puede usar en formulaciones de la presente invención es QS21, 3D-MPL y CpG o equivalente de las mismas, por ejemplo en una emulsión de aceite en agua o como una formulación liposómica.

De acuerdo con ello en una realización de la presente invención hay proporcionada una vacuna que comprende una proteína de fusión o una proteína pareja de fusión como se describe en el presente documento y un coadyuvante, por ejemplo como se describe anteriormente.

Combinación de PRAME y MAGE

40 En una realización de la presente invención se proporciona una composición que comprende (a) un componente de antigénico que comprende un antígeno PRAME o proteína de fusión como se describe en el presente documento y (b) un componente antigénico que comprende un antígeno MAGE o proteína de fusión como se describe en el presente documento. En una realización, la composición puede comprender adicionalmente un coadyuvante como se describe en el presente documento.

45 El antígeno MAGE para usar en la combinación puede comprender el antígeno MAGE de longitud total. Alternativamente, el antígeno MAGE puede comprender una parte inmunogénica de MAGE en la que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos se pueden eliminar de o sustituir en la secuencia de aminoácidos. En una realización de la presente invención, se pueden borrar 2 aminoácidos del extremo N-terminal de la secuencia MAGE. En una realización de la presente invención en la que el antígeno es MAGE-A3 o una parte inmunogénica del mismo, la secuencia de MAGE-A3 puede ser del aminoácido 3 al 314 de MAGE-A3.

Para la combinación descrita anteriormente, bien uno o bien ambos de los antígenos de PRAME y/o MAGE pueden ser parte de una proteína o proteínas de fusión como se describe en el presente documento, o los antígenos pueden estar presentes en otras proteínas de fusión o se pueden presentar como antígeno solo.

55 En una realización de la presente invención se proporciona una composición que comprende una proteína de fusión que comprende un antígeno PRAME y proteína pareja de fusión como se describe en el presente documento y una proteína de fusión que comprende un antígeno MAGE-A3 y proteína pareja de fusión como se describe en el presente documento. En una realización alternativa, la proteína de fusión que comprende el antígeno MAGE-A3 comprende o consiste en el antígeno MAGE-A3 y una proteína pareja de fusión que comprende aproximadamente los primeros 109 aminoácidos de proteína D, en los que están opcionalmente sustituidos uno o dos o más aminoácidos de la proteína D, y en los que la secuencia señal de proteína D está opcionalmente presente, además de los primeros 109 aminoácidos de proteína D.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden comprender adicionalmente opcionalmente uno o más aminoácidos como "engarces" entre las secuencias del antígeno y la proteína pareja de fusión o entre el antígeno y una marca de His, si está presente. Los aminoácidos pueden no estar relacionados con las secuencias del antígeno y/o pareja de fusión.

- 5 Las proteínas de fusión de la presente invención, como se describen en el presente documento, pueden comprender adicionalmente los aminoácidos Met-Asp-Pro en el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína de fusión. El aminoácido Met puede ser de la secuencia de la proteína D original o puede ser de una secuencia no relacionada.

En una realización, la secuencia de una proteína de fusión que comprende MAGE-A3 y proteína D para usar en la presente invención se muestra en la Figura 12 y la SEC ID N.º: 43.

- 10 La presente invención también se extiende a procedimientos de preparar dichas vacunas/composiciones.

EJEMPLOS

- 15 Se prepararon cuatro constructos de fusión y se referirán en el presente documento como ejemplos/constructos 1, 2, 3 y 4. Se preparó un constructo de codón optimizado a partir del ejemplo 3 y se designó como ejemplo 3a en el presente documento. Se preparó un constructo de codón optimizado a partir del ejemplo 4 y se designó como ejemplo 4a en el presente documento.

En los ejemplos 3a y 4a la secuencia con respecto a la parte de la proteína D de la molécula es la misma. Sin embargo, se modificaron ciertos codones en la región de PRAME, mejorando adicionalmente la expresión y, en el ejemplo 3a, el engarce entre PRAME y la marca de His se ha eliminado.

TABLA A Estructuras de Proteína de Fusión y Detalles de Plásmidos de los Ejemplos/Construcciones 1 a 4

N-terminal		C-terminal			
Ejemplo/ Construcción N.º	aminoácidos insertados mediante proceso de clonación	pareja de fusión	antígeno de cáncer	Secuencia de aminoácidos de engarce/marca de His	plásmido usado
1	MDP	20-127 de proteína D	PRAME	TSGHHHHHH	TCMP14
2	MDP	20-127 de proteína D	PRAME	-	TCMP14
3	MDP	20-127 de proteína D	PRAME	LEHHHHHH	pET21
4	MDP	20-127 de proteína D	PRAME	-	pET21
3a	MDP	20-127 de proteína D	PRAME	HHHHHH	pET26
4a	MDP	20-127 de proteína D	PRAME	-	pET26

Las proteínas de fusión de los ejemplos anteriores comprenden los aminoácidos 20-127 de la proteína D. Los aminoácidos Met, Asp y Pro están incluidos en el extremo N-terminal del fragmento de proteína D (es decir aminoácidos MDP-20-127 de proteína D). Se piensa que estos tres aminoácidos adicionales pueden ayudar a la estabilidad de la proteína y/o incrementar el nivel de la expresión de proteína de los mismos. El aminoácido 127 de la proteína D se condensa al extremo N-terminal de PRAME de longitud total (es decir el aminoácido 127 de proteína D se condensa al extremo N-terminal de PRAME). Se incluyó una marca marcadora de histidina, ayudando a la purificación, en tres de las seis proteínas. La secuencia exacta de la marca es dependiente del plásmido usado.

Se construyeron tres tipos diferentes de plásmidos, TCMP14 y pET21 o pET26: para cada plásmido, se incluyó el ADN que codifica la proteína de fusión con o sin una marca de histidina.

A menos que se establezca lo contrario la siguiente estrategia general se usó en la preparación de cada uno de los ejemplos.

Estrategia de clonación para la generación de proteína recombinante PD1/3-PRAME (con o sin marca de His) que usa vector TCMP14:

La amplificación de las secuencias presentadas en el plásmido TCMP14 se hizo usando una estrategia de PCR de tres etapas. El vector pHIC348 que contiene la secuencia de ADN que codifica el gen de la proteína D entero se ha obtenido del Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Suecia. La secuencia de ADN de proteína D se ha publicado por Janson y col. (1991) { Janson H, LO Heden, A Grubb, M Ruan, & A Forsgren. 1991. Infect Immun 59:119-125}. El vector de expresión pMG81 es un derivado de pBR322, en el que se introdujeron los elementos de control derivados del bacteriófago λ para transcripción y traducción de genes insertados foráneos (Shatzman y col., 1983) {Shatzman A, YS Ho, & M Rosenberg. 1983. Experimental Manipulation of Gene Expression. Inouya (ed) páginas 1-14. Academic NY}. Además, el gen de resistencia a ampicilina se intercambió con el gen de resistencia a kanamicina. La secuencia que codifica para la parte de proteína NS1 (aminoácidos 4 a 81) se sustituyó por múltiples sitios de clonación logrando pMG81 MCS. La secuencia que codifica para el 1/3 de proteína D (aminoácidos 20 a 127) se clonó dentro de pMG81 MCS usando sitios de restricción de BamHI y NcoI consiguiendo pMG81-1/3PD. Primero, la amplificación por PCR de la sección que corresponde a los aminoácidos 20-127 de la proteína D se hizo usando vector pMG81-1/3PD como plantilla y oligonucleótido de polaridad positiva:

5' ATA TAA CAT ATG GAT CCA AGC AGC CAT TCA TCA AAT 3' (CAN008; SEC ID N.º: 18) y antisentido:

5' CCA CAA ACG CCT TCG TTC CAT GGT TTC AAA GTT TTC TGT C 3' (CAN037; SEC ID N.º: 19).

El cADN de PRAME obtenido del Ludwig Institute, Bruselas, Bélgica se insertó en los sitios Bstx1-Not1 del vector pCADN1 (Invitrogen) generando vector recombinante pCADN-1-PRAME. La amplificación por PCR de la sección que corresponde a aminoácido de la proteína PRAME se hizo usando vector de pCADN-1-PRAME (GSKBio) como plantilla y oligonucleótido de polaridad positiva:

5' GAC AGA AAA CTT TGA AAC CAT GGA ACG AAG GCG TTT GTG G 3' (CAN036; SEC ID N.º: 20) y antisentido:

5' AGA GAG ACT AGT CTA GTT AGG CAT GAA ACA GGG GCA CAG 3' (CAN029; SEC ID N.º: 21) o

5' GGA GGA ACT AGT GTT AGG CAT GAA ACA GGG GCA CAG 3' (CAN002; SEC ID N.º: 22) dependiendo de si se añadió (CAN002) o no (CAN029) una marca de His. La secuencia final de PRAME insertada en el plásmido de TCMP14 se obtuvo tras amplificaciones por PCR usando las plantillas de gen de 1/3PD y de gen de PRAME que se generan en las etapas preliminares para plantilla y oligonucleótido de polaridad positiva: CAN008, y antisentido: CAN029 o CAN002 dependiendo si estuvo presente una marca de His (CAN002) o no (CAN029). Se añadieron también los sitios NdeI en los sitios del extremo 5' y SpeI en el extremo 3' para clonación del fragmento dentro del vector de TCMP14.

Construcción del diseño del vector para expresar la proteína recombinante 1/3PD-PRAME con o sin proteína recombinante de marca de His usando vector pET21:

Se usaron un plásmido de cADN recombinante llamado pCADN1-PRAME (como se describe en la estrategia previa) que contiene la secuencia que codifica para el gen PRAME y el vector PMG81-1/3PD (como se describe en la estrategia previa) que contiene la parte N-terminal de la secuencia codificante de la proteína D. La estrategia de clonación incluyó las siguientes etapas.

a) Primero, la secuencia de 1/3PD sin señal de secreción (secuencia secreción o señal) se amplificó por PCR a partir de plásmido PMG81-1/3PD usando el oligonucleótido de polaridad positiva: 5' AGAGAGCATATGAGCAGCCATTCATCAAATATGGCG (CAN040; SEC ID N.º: 22), y el antisentido:

5' ACGTGGGCGGCCGCGGTTTCAAAGTTTTCTGTCTATTCTAA (CAN032; SEC ID N.º: 23);

se añadieron también los sitios NdeI del extremo 5' y NotI en el extremo 3' para clonación del fragmento dentro del vector pET21b(+).

b) La secuencia de PRAME se amplificó por PCR a partir de plásmido pCADN1-PRAME usando el oligonucleótido de polaridad positiva:

5' TTGTTGGCGGCCGCAATGGAACGAAGGCGTTTGTGGGGT (CAN033; SEC ID N.º: 25), y el antisentido:

5' GGAGGACTCGAGGTTAGGCATGAAACAGGGGCACAG (CAN034; SEC ID N.º: 26); se añadieron también los sitios Not1 en el extremo 5' y Xho1 en sitios del extremo 3' para clonación del fragmento dentro del vector pET21b. Esta amplificación dio como resultado la adición en la parte C-terminal de la proteína de dos aminoácidos, Leu y Glu, seguidos por 6 His en el plásmido pET21b(+). Para la generación de la proteína sin marca de His, se añadió un codón de parada (TAG) en el extremo 3' del gen de PRAME usando CAN033 y CAN035 (antisentido: 5' GGAGGACTCGAGCTAGTTAGGCATGAAACAGGGGCACAG (CAN035; SEC ID N.º: XX)) en vez de CAN033 y CAN034.

c) Clonación dentro de plásmido pET21b(+) (Invitrogen) de los fragmentos amplificados anteriores.

d) Eliminación de sitio Not1 entre 1/3PD y PRAME usando Kit de Mutagénesis Dirigida a Sitio QuikChange II (Stratagene) y el oligonucleótido de polaridad positiva:

5' CAGAAAACTTTGAACCATGGAACGAAGGCG (CAN106; SEC ID N.º: XX), y el antisentido:

5' cgccctcgctccatggttcaagtttctg (CAN107; SEC ID N.º: XX).

e) Adición de dos aminoácidos Asp y Pro tras el Met en posición 1 en el N-terminal de 1/3 de la proteína D mediante mutagénesis y usando el oligonucleótido de polaridad positiva:

5' GGAGATACATATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGG (CAN104; SEC ID N.º: XX) y el antisentido:

5' CCATATTTGATGAATGGCTGCTTGGATCCATATGTATATCTCC (CAN105; SEC ID N.º: XX).

Construcción del diseño de vector para expresar la proteína recombinante 1/3PD-PRAME de coón optimizado (sin o con marca de His) en vector pET26:

El gen PRAME experimentó optimización de codón y se clonó en armazón de pGA4 con la adición de sitios Not1 y Xho1 en el extremo 5' y el extremo 3' del gen optimizado respectivamente.

Este plásmido, llamado 0606420pGA4, se usó para clonar el gen en fusión con el PD1/3 en el vector pET26 usando las siguientes etapas.

a) Eliminación del fragmento Not1 / Xho1 que corresponde a la secuencia de PRAME optimizada con un codón de parada en el extremo 3' del gen del plásmido 0606420pGA4.

b) Clonación del fragmento de PRAME optimizado dentro de un plásmido pET26b(+) que contiene el Nde1/Not1 clonado previamente de 1/3PD con oligonucleótidos CAN040 y CAN032 como se describe anteriormente y donde los aminoácidos Asp y Pro se añadieron en la parte N-terminal mediante procedimiento de mutagénesis con oligonucleótidos CAN104 y CAN105.

c) Eliminación del sitio Not1 mediante mutagénesis con oligonucleótidos: de polaridad positiva

5' GACAGAAAACTTTGAACCATGGAACGTCGTCGTCTGTGG (CAN123; SEC ID N.º: XX) y antisentido

5' CCACAGACGACGACGTTCCATGGTTTTCAAAGTTTTCTGTC (CAN124; SEC ID N.º: XX). Esto dio como resultado la proteína de fusión de codón optimizado 1/3PD-PRAME sin marca de His.

d) El plásmido se usó después como una plantilla para la generación de 1/3PD-PRAME de codón optimizado con plásmido de 6 His. La amplificación por PCR de la proteína de fusión se hizo con oligonucleótidos de polaridad positiva

5' GGAATTCATATGGATCCAAGCAGCCATTC (CAN199; SEC ID N.º: XX) y un

5' GGAGCTCTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTCGGCATAAAGCACGGGC (CAN198; SEC ID N.º: XX); se añadieron también los sitios Nde1 en el extremo 5', Xho1 en el extremo 3' seguidos por 6 His y un codón de parada para la clonación del fragmento dentro del vector de pET26b(+).

e) Clonación del fragmento amplificado en plásmido pET26b(+) de Invitrogen.

Para la producción de la proteína de fusión, se ha clonado el constructo de ADN dentro del vector de expresión TCMP14. Este plásmido utiliza señales del ADN del fago lambda para dirigir la transcripción y traducción de genes foráneos insertados. El vector contiene el promotor PL lambda, el operador OL y dos sitios de utilización (NutL y NutR) para mitigar los efectos de polaridad transcripcional cuando se proporciona la proteína N (Gross y col., 1985. Mol. & Cell. Biol. 5:1015).

El plásmido que expresa la proteína de fusión pD-PRAME se diseñó de forma que los aminoácidos de PRAME se añadieron a la parte C-terminal de un derivado de 108 aminoácidos de pD sin su secuencia señal (secuencia de secreción o secuencia señal) (es decir restos 20-127). A esta construcción, se añadieron tres aminoácidos no relacionados (Met y Asp y una prolina) en el extremo N-terminal del derivado de pD, y para ciertas construcciones se incluyó una marca de His en el extremo C-terminal de los aminoácidos de PRAME (véase tabla A anteriormente). Este constructo podría describirse alternativamente como derivado que contiene 109 aminoácidos de pD, si la Met N-terminal se considera que viene de la secuencia de pD.

Cepa del Huésped y Transformación

Se transformaron los huéspedes de cepa de *E. coli* AR58 (Mott y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 82, páginas 88-92, enero de 1985, Biochemistry) con ADN plasmídico para ejemplos/ constructos 1 y 2.

5 La cepa de *E. coli* lisogénica AR58 usada para la producción de Ejemplos/constructos 1 y 2 es un derivado de la cepa K12 N99 de *E. coli* NIH estándar (F- su- galK2, lacZ- thr-). Ella contiene un fago lambda lisogénico defectivo (galE::TN10, 1 Kil- cl857 DH1). El fenotipo Kil- evita el término de la síntesis macromolecular del huésped. La mutación cl857 confiere una lesión sensible a temperatura al represor cl. La delección de DH1 elimina el operón derecho del fago lambda y los locis bio, uvr3, y chlA del huésped. La cepa AR58 se generó mediante transducción de N99 con una reserva de fago lambda P previamente dejada crecer en un derivado de SA500 (galE::TN10, 1 Kil-cl857 DH1). Se seleccionó la introducción del lisógeno defectivo dentro de N99 con tetraciclina en virtud de la presencia de un transposón de TN10 que codifica para la resistencia a tetraciclina en el gen galE adyacente. N99 y SA500 son cepas K12 de *E. coli* derivadas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el National Institutes of Health.

15 Los vectores que contienen el promotor PL, se introducen dentro de un huésped lisogénico *E. coli* estabilizando el ADN plasmídico. Las cepas de huésped lisogénico contienen ADN del fago lambda defectivo en replicación integrado dentro del genoma (Shatzman y col., 1983; en Experimental Manipulation of Gene Expression. Inouya (ed) páginas 1-14. Academic Press NY). El ADN del fago lambda dirige la síntesis de la proteína represora cl que se une al represor OL del vector y evita la unión de RNA polimerasa al promotor de PL y de este modo la transcripción del gen insertado. El gen de cl de la cepa de expresión AR58 contiene una mutación sensible a temperatura tal que la transcripción dirigida a PL se puede regular mediante cambio de temperatura, es decir un incremento en la temperatura de cultivo inactiva el represor y se inicia la síntesis de la proteína foráneas. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas foráneas especialmente de aquellas que pueden ser tóxicas para la célula (Shimataka & Rosenberg, 1981. Nature 292:128).

25 Los huéspedes de cepa de *E. coli* BLR (DE3) Novagen, WI, EE.U.U. (número de catálogo: 69053-4) BLR (DE3) Novagen, WI, USA (número de catálogo: 69053-4), BLR es un derivado *recA* de BL21 que incrementa los rendimientos de monómeros de plásmidos y puede ayudar a estabilizar plásmidos objetivo que contienen secuencias repetitivas o cuyos productos pueden causar la pérdida del profago DE3 (1, 2), se transformaron con ADN de plásmidos de los ejemplos/constructos 3 y 4.

30 Cada una de las transformaciones se llevó a cabo mediante procedimientos estándar con células tratadas con CaCl₂ (Hanahan D. « Plasmid transformation by Simanis. » en Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135.).

Crecimiento e inducción de cepa del huésped bacteriano

• Cultivo

35 Las bacterias se dejaron crecer en 20 ml de caldo (BD) de Luria-Bertani (LB) + glucosa al 1% (p/v) (Laboratoire MAT, número de catálogo: GR-0101) + antibiótico (100 µg/ml de carbenicilina para pET21b, 40 µg/ml de kanamicina para TCMP14). Se incubaron cultivos a 33°C, para células AR58 y a 37°C, para células BLR (DE3) hasta una D.O._{600 nm} alrededor de 0,8.

• Inducción

40 A D.O._{600 nm} alrededor de 0,8, los cultivos BLR (DE3) se indujeron a β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo 1 mM (IPTG; EMD Chemicals Inc., número de catálogo: 5815) y se incubaron durante 2 horas o 3 horas a 37°C aunque la solubilidad se puede incrementar si se usa una temperatura menor.

A D.O._{600 nm} alrededor de 0,8, los cultivos AR58 se indujeron mediante activación por calor a 37°C y se incubaron durante 7 horas.

El crecimiento bacteriano fue adecuado para los dos sistemas de expresión.

• Extracción y Purificación de la Proteína

45 Tras la expresión del polipéptido en cultivo, las células se recogen típicamente mediante centrifugación después se rompen por medios físicos o químicos (si el polipéptido expresado no es secretado al medio) y el extracto en bruto resultante se retiene para aislar el polipéptido de interés. El Reactivo de Extracción de Proteínas BugBuster™ se usa bajo condiciones recomendadas por los suministradores (Novagen).

Purificación de Proteína PD1/3-Prame-his

50 Se resuspendió pasta de células de *E. coli* en tampón de Tris 20 mM de pH 8,5 después se hizo pasar a través de sistema homogeneizador (Panda de Niro Soavi S.p.A. - 2 pases - 75000000 pascuales (750 bar)). Después de adición de MgCl₂ 2 mM y Benzona (50 U/ml), se incubó el homogenado 1 hora a temperatura ambiente (TR) bajo agitación suave después se centrifugó 30 minutos a 15900 g y TR. El sedimento resultante se resuspendió en tampón de Tris 20 mM a pH 8,5 que contiene dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% y glutatión 60 mM y se incubó 30 minutos a TR bajo agitación suave. Después de 30 minutos de centrifugación a 15900 g y TR, se eliminó el sedimento.

El sobrenadante de centrifugación se diluyó 10 veces en tampón de Tris 20 mM que contiene urea 6,66 M, cloruro de sodio 0,333 M (NaCl) e imidazol 11,11 mM y después se sometió a separación cromatográfica en una columna de afinidad con ion metálico de níquel (Sefarosa IMAC 6 FF - GE Healthcare) equilibrada en un tampón de Tris 20 mM

de pH 8,5 que contiene SDS al 0,1%, urea 6,0 M, NaCl 0,3 M e imidazol 10 mM. Después del lavado de la columna con tampón de Tris 20 mM de pH 8,5 que contiene sarcosilo al 0,5%, urea 6,0 M, NaCl 0,3 M e imidazol 10 mM, se eluyó el antígeno de la columna incrementando la concentración de imidazol hasta 40 mM en el mismo tampón de lavado. Después de la adición de fosfato hasta 50 mM, se hizo pasar el eluato positivo en antígeno a través de una columna de Hidroxiapatita Cerámica para Macro-Prep de tipo II (Bio-Rad) equilibrada en un tampón de Tris 20 mM a pH 8,5 que contiene fosfato 50 mM, sarcosilo al 0,5%, urea 6,0 M y NaCl 0,3 M. El flujo través de hidroxiapatita que contenía el antígeno se diafiltró frente a tampón de borato 5 mM de pH 9,8 que contenía sacarosa al 3,15% en una membrana Omega de 30 kDa (Pall). El retentado de ultrafiltración se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45/0,22 μm (Sartorius). El material purificado se almacenó a -70°C .

10 Se ha usado también un proceso de purificación alternativo, que difiere del anterior proceso en las siguientes etapas:

- Sin tratamiento con benzonasa

- Sin cambio de SDS a sarcosilo en columna IMAC (SDS de extracción hasta la etapa HA)

- El tampón usado para la diafiltración fue tampón de Tris 5 mM de pH 8,5 - arginina 0,5 M.

15 Este proceso de purificación alternativo dio como resultado eliminación de SDS incompleta con valor residual alrededor del 0,05% y el 0,085%.

• Purificación

Las proteínas recombinantes expresadas se purificaron a partir de fracciones de sobrenadante obtenidas después de centrifugación de *E. coli* inducida usando una resina de quelación de metales His Binol(QIAGEN, Chatsworth, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la resina.

20 Caracterización de la Proteína

SDS-Page:

Gel: gel de Bis-Tris al 4-12% de NuPAGE 15 ó 26 pocillos, 1,0 mm (número de catálogo de Invitrogen: NP0323BOX)

25 Véanse figuras 1 y 2 más adelante, que muestran análisis por SDS page de ejemplo 3 y 4 y 3a y 4a respectivamente, en las que las proteínas 1/3PD-PRAME recombinantes diferentes con o sin marca de His migran sobre el gel a un peso molecular aparente de ~ 70 kDa. Las proteínas recombinantes se encuentran como cuerpos de inclusión en el lisado de células de *E. coli*, después de inducción.

La preparación de muestras, tampones y condiciones de migración se realizaron bajo condiciones recomendadas por los suministradores (Invitrogen). Se cargaron 10 μl de todas las preparaciones (antes de inducción (BI) y después de inducción (AI)) en pocillos que corresponden a 100 μl de equivalente de cultivo.

30 Leyenda de la fig. 1: análisis por SDS page después de tinción con azul de Coomassie de 1/3PD-PRAME recombinante después de inducción con IPTG de cepa BLR DE3 de *E. coli* transformada con pET21 recombinante. Se ha cargado en gel un equivalente de 100 μl de cultivo después de 2 horas de inducción en cepa BLR DE3 con IPTG 1 mM a 25, 30 ó 37°C. Clon nº3 (1/3PD-PRAME / pET21) y Clon nº4 (1/3PD-PRAME-His / pET21) están presentes en gel antes (BI) y después (AI) de inducciones en fracciones soluble (sobrenadante) y no soluble (sedimento). Carriles 1 y 10: pretinción de Intervalo Amplio Estándar (BioRad Cat nº161-0318), carril 2 (clon nº3, BI, sobrenadante), carril 3 (clon nº 3, BI, sedimento), carril 4 (clon nº 3, AI, 25°C, sobrenadante), carril 5 (clon nº 3, AI, 25°C, sedimento), carril 6 (clon nº 3, AI, 30°C, sobrenadante), carril 7 (clon nº 3, AI, 30°C, sedimento), carril 8 (clon nº 3, AI, 37°C, sobrenadante), carril 9 (clon nº 3, AI, 37°C, sedimento), carril 11 (clon nº 4, BI, sobrenadante), carril 12 (clon nº 4, BI, sedimento), carril 13 (clon nº 4, AI, 25°C, sobrenadante), carril 14 (clon nº 4, AI, 25°C, sedimento), carril 15 (clon nº 4, AI, 30°C, sobrenadante), carril 16 (clon nº 4, AI, 30°C, sedimento), carril 17 (clon nº 4, AI, 37°C, sobrenadante), carril 18 (clon nº 4, AI, 37°C, sedimento).

45 Leyenda de la figura 2: análisis por SDS page después de tinción con azul de Coomassie de 1/3PD-PRAME recombinante después de inducción con IPTG de cepa BLR DE3 *E. coli* transformada con pET26 recombinante. Un equivalente de 100 μl de cultivo después de 2 horas de inducción en cepa BLR DE3 con IPTG 1 mM a 25, 30 o 37°C se ha cargado en gel. Clon nº 3a (1/3PD-PRAME de codón optimizado / pET26) y Clon nº 4a (1/3PD-PRAME-His de codón optimizado / pET26) están presentes en gel antes (BI) y después (AI) de inducciones en fracciones soluble (sobrenadante) y no soluble (sedimento). Carriles 2 y 10: pretinción de Intervalo Amplio Estándar (BioRad Cat nº 161-0318), carril 1 (clon nº 3a, BI, sobrenadante), carril 3 (clon nº3a, BI, sedimento), carril 4 (clon #3a, AI, 25°C, sobrenadante), carril 5 (clon #3a, AI, 25°C, sedimento), carril 6 (clon nº 3a, AI, 30°C, sobrenadante), carril 7 (clon nº 3a, AI, 30°C, sedimento), carril 8 (clon nº 3a, AI, 37°C, sobrenadante), carril 9 (clon nº 3a, AI, 37°C, sedimento), carril 11 (clon nº 4a, BI, sobrenadante), carril 12 (clon nº 4a, BI, sedimento), carril 13 (clon nº4a, AI, 25°C, sobrenadante), carril 14 (clon nº 4a, AI, 25°C, sedimento), carril 15 (clon nº 4a, AI, 30°C, sobrenadante), carril 16 (clon nº 4a, AI, 30°C, sedimento), carril 17 (clon nº 4a, AI, 37°C, sobrenadante), carril 18 (clon nº 4a, AI, 37°C, sedimento).

Transferencia Western

55 Las membranas se bloquearon durante 30 minutos a 37°C, 60 RPM usando solución reciente de leche al 3%/PBS 1X. Después de la incubación de bloqueo, se añadieron los anticuerpos primarios (anti-PRAME de conejo; GSK Biologicals S.A.) a dilución 1:5000 o marca de His α -6X (AbCam) a dilución 1:3000 en solución reciente de leche al 3%/PBS 1X durante 1 hora a 37°C, 60 RPM. Después de eso, las membranas se lavaron tres veces 5 minutos a temperatura ambiente usando Tween20 al 0,02%/PBS 1X. Se añadieron anticuerpos secundarios (anti-IgG (H+L) de conejo de asno perox (Jackson laboratory)) a dilución 1:20000 usando solución reciente de leche al 3%/PBS 1X. Se

ES 2 393 812 T3

incubaron las membranas durante 1 hora a 37°C, 60 RPM. Después de eso, se lavaron tres veces las membranas 5 minutos a temperatura ambiente usando Tween20 al 0,02%/PBS 1X antes de las exposiciones de membranas a sustrato de peroxidasa (KH₂PO₄, 10 mM; (NH₄)₂SO₄, 10 mM; O-dianisidina, al 0,01% y peróxido de hidrógeno al 0,045%) o sustrato de fosfatasa alcalina (Sigma Fast) siguiendo las recomendaciones del suministrador.

5 Análisis molecular:

Ejemplo/constructo 1

Análisis	Proteína Completa
Longitud	629 aa
Peso Molecular	71629,96 p.m.
1 microgramo =	13,961 pMoles
Coeficiente de Extinción Molar	67680
1 A[280] a Corr. a	1,06 mg/ml
A[280] de 1 mg/ml	0,94 UA
Punto isoelectrico	6,41
Carga a pH 7	-5,84

Ejemplo/constructo 2

Análisis	Proteína Completa
Longitud	620 aa
Peso Molecular	70561,90 p.m.
1 microgramo =	14,172 pMoles
Coeficiente de Extinción Molar	67680
1 A[280] a Corr. a	1,04 mg/ml
A[280] de 1 mg/ml	0,96 UA
Punto isoelectrico	6,28
Carga a pH 7	-6,36

10 Ejemplo/constructo 3

Análisis	Proteína Completa
Longitud	628 aa
Peso Molecular	71627,01 p.m.
1 microgramo =	13,961 pMoles
Coeficiente de Extinción Molar	67680

(continuación)

1 A[280] a	1,06 mg/ml
Corr. a	
A[280] de 1 mg/ml	0,94 UA
Punto isoelectrico	6,34
Carga a pH 7	-6,84

Ejemplo/constructo 4

Análisis	Proteína Completa
Longitud	620 aa
Peso Molecular	70561,90 p.m.
1 microgramo =	14,172 pMoles
Coeficiente de Extinción Molar	67680
1 A[280] Corr. a	1,04 mg/ml
A[280] de 1 mg/ml	0,96 UA
Punto isoelectrico	6,28
Carga a pH 7	-6,36

5 **Ejemplo 5**

Evaluación de la producción de proteínas con o sin la señal de secreción (secuencia de secreción o secuencia señal) de 1/3 de la proteína D en la proteína de fusión.

Tabla B

Proteína	Nivel de Expresión
PD1/3-PRAME con señal de secreción (SS)	+
PD1/3-PRAME sin señal de secreción (SS)	+++

Fig. 11: análisis por SDS page después de tinción por azul de Coomassie de 1/3PD-PRAME recombinante con o sin señal de secreción después de inducción con IPTG de cepa BL21 DE3 *E. coli* transformada con pET21 recombinante. Se ha cargado sobre gel un equivalente de 100 µl de cultivo después de 3 horas de inducción en cepa BL21 DE3 con IPTG 1 mM a 37°C. Aquellos constructos se presentan en gel antes (BI) y después (AI) de inducciones en fracciones soluble (sobrenadante) y no soluble (sedimento). Carril 1: pretinción de Intervalo Amplio Estándar (BioRad Cat161-0318), carril 2 (pD1/3-PRAME + SS, BI, sobrenadante), carril 3 (pD1/3-PRAME + SS, BI, sedimento), carril 4 (pD1/3-PRAME + SS, AI, sobrenadante), carril 5 (pD1/3-PRAME + SS, AI, sedimento), carril 6 (pD1/3-PRAME + SS + His, BI, sobrenadante), carril 7 (pD1/3-PRAME + SS + His, BI, sedimento), carril 8 (pD1/3-PRAME + SS + His, AI, sobrenadante), carril 9 (pD1/3-PRAME + SS + His, AI, sedimento), carril 10 (pD1/3-PRAME sin SS, BI, sobrenadante), carril 11 (pD1/3-PRAME sin SS, BI, sedimento), carril 12 (pD1/3-PRAME sin SS, AI, sobrenadante), carril 13 (pD1/3-PRAME sin SS, AI, sedimento), carril 14 (pD1/3-PRAME sin SS + His, BI, sobrenadante), carril 15 (pD1/3-PRAME sin SS + His, BI, sedimento), carril 16 (pD1/3-PRAME sin SS + His, AI, sobrenadante), carril 17 (pD1/3-PRAME sin SS + His, AI, sedimento).

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de PD-PRAME-His formulada en AS01B o AS15: intervalo de dosis de antígeno en una dosis constante de coadyuvante.

Propósito: intervalo de dosificación de antígeno para seleccionar la mejor dosis a usar en experimentos preclínicos

25 Protocolo:

6 grupos de 12 ratones CB6F1 recibieron inyecciones intra-musculares (IM) en el día 0 y el día 14 de:

1. PBS
2. PRAME (50* µg) en AS01B o AS15
3. PRAME (10 µg) en AS01B o AS15
4. PRAME (2 µg) en AS01B o AS15
5. PRAME (0,4 µg) en AS01B o AS15
6. PRAME (0,08 µg) en AS01B o AS15

* 44,7 µg realmente administrados en lugar de la dosis pretendida de 50 µg

AS01B es una formulación coadyuvante liposómica que comprende QS21 y 3D-MPL; AS15 es una formulación coadyuvante liposómica que comprende QS21, 3D-MPL y CpG.

- 10 El constructo usado en este ejemplo era ejemplo/constructo 3a (pET26 con una marca de His), proporcionado en tampón de Tris 5 mM de pH 8.5 - Arginina 0,5 M. La proteína proporcionada en un tampón borato con sacarosa se puede usar también.

Lecturas:

- 15 • Tinción de Citoquina Intracelular (ICS) 14 días tras 2 inyecciones después de restimulación *in vitro* de células del bazo (4 reservas de 3 ratones por grupo) con la reserva de péptidos PRAME a 1 µg/ml/péptido (15-mero)

Respuesta de CD4 (coadyuvante AS01B)

Se muestran resultados de ICS para citoquinas CD4 para el coadyuvante AS01B en la figura 3. En este experimento se puede concluir que la mejor dosis de antígeno PRAME para inducir una respuesta de CD4 en AS01B bajo estas condiciones parece ser 2 µg.

- 20 Respuesta de CD8 (coadyuvante AS01B)

Se muestran resultados de ICS para citoquinas CD8 para el coadyuvante AS01B en la figura 4. Los datos parecen mostrar una respuesta de CD8 muy baja y una heterogeneidad de la respuesta intra-grupo.

Respuesta de CD4 (coadyuvante AS15)

- 25 Se muestran resultados de ICS para citoquinas CD4 para el coadyuvante AS15 en la figura 5. Estos datos parecen mostrar que se indujo una respuesta de CD4 similar con 44 µg, 10 µg, 2 µg y 0,4 µg de PRAME formulado en AS15; con una respuesta decrecida inducida con 0,08 µg de PRAME

Respuesta de CD8 (coadyuvante AS15)

Se muestran resultados de ICS para citoquinas CD8 para el coadyuvante AS15 en la figura 6. Estos datos parecen no mostrar ninguna respuesta de CD8 (valor de fondo en el grupo de PBS)

30 Ejemplo 7

En resumen, para las invenciones descritas en el presente documento, se puede usar el siguiente sumario para describir constructos específicos de PD1/3-PRAME que se han generado hasta el momento:

Constructos usados para PD1/3-PRAME

- No se incluye ninguna secuencia señal de proteína D (aminoácidos 2 a 19 de proteína D)
- 35 - Se incluye la metionina de proteína D (AA 1 de la proteína D)
- Dos AA no relacionados (Asp y Pro) sustituyen a los aminoácidos Lys-2 y Leu-3 de proteína D
- Se incluyen los primeros 109 AA de proteína D después de la secuencia señal de proteína D (109 aminoácidos que incluyen la primera Met en extremo N-terminal + AA20 a 127 de la proteína D)
- Se incluyen AA 1 - 509 de PRAME (secuencia original de longitud total de PRAME)
- 40 - Con o sin una marca de His compuesta de uno de los siguientes:
 - Tres aminoácidos no relacionados (Thr, Ser y Gly) + 6 residuos de His para clonar en plásmido TCMP14; o
 - Dos aminoácidos no relacionados (Leu y Glu) + 6 residuos de His para clonar en plásmido de pET21; o
 - 6 residuos de His para clonar en plásmido pET26.

Proteína pD1/3 - PRAME +/- marca de His :

		pD 1/3 20 - 127	PRAME 1 - 509	
Extremo N Terminal MDP		pD 1/3	PRAME	C terminal
Extremo N Terminal MDP		pD 1/3	PRAME	TSG 6xHis (en TCMP14) extremo C terminal
Extremo N Terminal MDP		pD 1/3	PRAME	LE 6xHis (en pET21) extremo C terminal
M Extremo N Terminal MDP		pD 1/3	PRAME	6xHis (en pET26) extremo C terminal

Se muestra una secuencia de aminoácidos destacada de ejemplos de constructos de la presente invención en la figura 7.

5 Se muestran alineaciones de los siguientes constructos en figuras 8, 9 y 10:

Alineación entre LipoD-MAGE3-His y D1/3-PRAME-His (figura 8)

Alineación entre la secuencia compartida de la proteína D original de *Haemophilus influenzae* y la LipoD-MAGE3-His (figura 9)

10 Alineación entre la secuencia compartida de la proteína D original de *Haemophilus influenzae*, la LipoD-MAGE3-His y la pD1/3-PRAME-His (figura 10).

Formulación de preparación de vacuna usando proteínas de fusión:

Las proteínas de fusión de la invención se pueden formular dentro de vacunas que bien están conducidas o bien no. En una realización, como un coadyuvante, la formulación puede comprender una mezcla de minofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) y QS21 en una emulsión de aceite en agua. El sistema coadyuvante SBAS2 se ha descrito previamente en el documento WO 95/17210. El coadyuvante para usar en la presente invención puede comprender alternativamente monofosforil lípido A 3 de-O-acilado (3D-MPL), QS21 y CpG en una formulación de aceite en agua o en una formulación liposómica.

20 **3D-MPL:** es un inmunoestimulante derivado del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria gram-negativa *Salmonella minnesota*. MPL se ha desacilado y carece de un grupo fosfato en el resto de lípido A. Este tratamiento químico reduce drásticamente la toxicidad mientras que mantiene las propiedades inmunoestimuladoras (Ribi, 1986).

Se cree que 3D-MPL combinada con diversos vehículos puede potenciar fuertemente tanto la inmunidad humoral como un tipo TH1 de inmunidad celular.

25 **QS21:** es una molécula de saponina natural extraída de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina. Una técnica de purificación desarrollada para separar las saponinas individuales de los extractos en bruto de la corteza, permitió el aislamiento de la saponina particular, QS21, que es un glicósido triterpeno que demuestra actividad coadyuvante más fuerte y toxicidad menor comparado con el componente parental. QS21 ha mostrado activar los CTL restringidos del MHC de clase I a Ag de varias subunidades, así como estimular proliferación linfocítica específica de Ag (Kensil, 1992).

30 Se cree que puede haber un efecto sinérgico de combinaciones de MPL y QS21 en la inducción tanto de respuestas inmunes celulares de tipo TH1 como de respuestas inmunes humorales.

35 **La emulsión de aceite en agua** comprende una fase orgánica hecha de 2 aceites (un tocoferol y escualeno), y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como emulsionante. La emulsión comprendió escualeno al 5% tocoferol al 5% Tween 80 al 0,4% y tuvo un tamaño de partícula promedio de 180 nm y se conoce como SB62 (véase documento WO 95/17210). Las gotitas del aceite resultante tendrían un tamaño de aproximadamente 180 nm.

El coadyuvante para usar en la presente invención se puede formular como una combinación de MPL y QS21, en una emulsión de aceite en agua o en una formulación liposómica. Esta preparación debería transportarse en viales de 0,7 ml para mezclarse con antígeno liofilizado o proteína de fusión (viales que contienen de 30 a 300 µg de antígeno).

40 Se pueden usar también oligonucleótidos inmunoestimuladores. Los oligonucleótidos de ejemplo para usar en coadyuvantes o vacunas de la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen CpG, que contienen generalmente dos o más motivos de dinucleótido CpG separados por al menos tres, más frecuentemente al menos seis o más nucleótidos. Un motivo de CpG es un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos CpG son típicamente desoxinucleótidos. En una realización el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace de fosforotioato, aunque fosfodiéster y otros vínculos

45

internucleótido están dentro del alcance de la invención. También están incluidos dentro del alcance de la invención oligonucleótidos con vínculos internucleótido mixtos. Procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforotioato se describen en los documentos US 5.666.153, US 5.278.302 y WO 95/26204.

Ejemplos de oligonucleótidos son como sigue:

- 5 TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826; SEC ID N.º: 36)
 TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758; SEC ID N.º: 37)
 ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006; SEC ID N.º: 38)
 TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668; SEC ID N.º: 39)
- 10 TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456; SEC ID N.º: 40),

las secuencias pueden contener enlaces internucleótido modificados por fosforotioato.

Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender una o más secuencias anteriores en que tienen deleciones o adiciones a las mismas inconsecuentes.

- 15 Los oligonucleótidos CpG se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo véase el documento EP 468520). Convenientemente, tales oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador automatizado.

- 20 En una realización de la presente invención una combinación coadyuvante para usar en la invención incluye uno o más de los componentes siguientes: 3D-MPL y QS21 (EP 0 671 948 B1); emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (documento WO 95/17210, documento WO 98/56414); o 3D-MPL formulado con otros vehículos (documento EP 0 689 454 B1). Otros sistemas coadyuvantes que se pueden usar en la presente invención comprenden una combinación de 3D-MPL, QS21 y un oligonucleótido CpG como se describe en los documentos US6558670 y US6544518.

La vacuna final se puede obtener después de la reconstitución de la formulación liofilizada.

Referencias:

- 25 1. A. Roca (U. de Wisconsin), comunicación personal.
 2. Studier, F.W. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 37–44.
 3. Jan H. Kessler^a y col. *The Journal of Experimental Medicine*, volumen 193, número 1, 1 de enero de 2001 73-88,
 4. Ikeda H *et al* *Immunity*, Feb; 6(2): 1997, 199-208

30

SEC ID N.º: 1

Secuencia de ADN para ejemplo 1

atggatccaagcagccattcatcaaataatggcgcaatacccaaatgaaatcagacaaaatcattattgctc
accgtggtgctagcgggtatattaccagagcatacgttagaatctaaagcacttgcggttgccacaacaggc
tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggcgttagtggttattcacgatcactttta
gatggcttgactgatgttgcgaaaaattcccacatcgtcatcgtaaagatggccgttactatgtcatcg
actttaccttaaagaaattcaaagtttagaaatgacagaaaactttgaaacctggaacgaaggcggtt
gtgggggttccattcagagccgatacatcagcatgagtgtgtggacaagcccacggagacttgtggagctg
gcagggcagagcctgctgaaggatgaggccctggccattgccgccctggagttgctgcccagggagctct
tcccgccactcttcatggcagcctttgacgggagacacagccagaccctgaaggcaatggtgcaggcctg
gcccttcacctgcctcctctgggagtgtgatgaagggacaacatcttcacctggagaccttcaaagct
gtgcttgatggacttgatgtgctccttgcccaggaggttcgcccaggaggtggaaacttcaagtgtgg
atttacggaagaactctcatcaggacttctggactgtatggtctggaaacagggccagctctgtactcatt
tccagagccagaagcagctcagcccatgacaaagaagcgaagagtagatggtttgagcacagaggcagag
cagcccttcattccagtagaggtgctcgttagacctgttcccaaggaaggtgcctgtgatgaattgttct
cctacctcattgagaaagtgaagcgaagaaaaatgtactacgcctgtgctgtaagaagctgaagatttt
tgeaatgcccatgcaggatataagatgatcctgaaaatggtgcagctggactctattgaagatttgaa
gtgacttgtacctggaagctaccaccttggcgaaaattttctccttacctgggcccagatgattaatctgc
gtagactcctcctctcccacatccatgcactctcctacatttccccggagaaggaagagcagtatatcgc
ccagttcacctctcagttcctcagctctgcagtgctgcaggtctctatgtggactctttattttctct
agagggccgctggatcagttgctcagggcagctgatgaacccttggaaacctctcaataactaactgcc
ggctttcggaaggggatgtgatgcactgtcccagagtcaccagcgtcagtcagctaatgtgctgagct
aagtggggatcatgctgaccgatgtaagtcccagaccctccaagctctgctggagagagcctctgccacc
ctccaggacctggctttgatgagtgtgggatcacggatgatcagctccttgccctcctgccttccctga
gccactgctcccagcttacaaccttaagcttctacgggaattccatctccatctcgccttgccagagct
cctgcagcactcatcgggctgagcaatctgacccacgtgctgtatcctgtccccctggagagttatgag
gacatccatggtaccctccacctggagaggttgccatctcgcagcaggtcagggagttgctgtgtg
agttggggcggcccagcatggtctggcttagtgccaaccctgtcctcactgtggggacagaaccttcta
tgacccggagcccatcctgtgccctgtttcatgctaacactagtggccaccatcaccatcaccat

SEC ID N.º: 2

5 Secuencia de aminoácidos para ejemplo 1

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLVVIHDHFL
DGLTDVAKKFPHRHRKDGYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSPPRLVEL
AGQSLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGLVMKQHLHLET FKA
VLDGLDVLLAQEVRPRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMTKKRKVDGLSTEA
E QPFI PVEVLVDFLKEGACDELFSYLIEKVKRKNVLRLLCCKLKI FAMPQDIK MILK MVQLDSIEDLE
VTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLSH IHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFL
RGRLDQLLRHVMNPLETLSITNCR LSEGDMHLSQSPSVLSVLSLSGVMLTDVSP EPLQALLERASAT

LQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSFYGN SISISALQSLLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
DIHGT LHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPNTSGHHHHHH

SEC ID N.º: 3

Secuencia de ADN para ejemplo 2

atggatccaagcagccattcatcaaataatggcgaaataccctaaatgaaatcagacaaaatcattattgctc
accgtggtgctagcggttatttaccagagcatacggttagaatctaaagcacttgcggttgccacaacaggc
tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggcgttagtggttattcacgatcactttta
gatggcttgactgatgttgcgaaaaatcccacatcgtcatcgtaaagatggccgttactatgtcatcg
actttacctaaaagaaattcaaagtttagaaatgacagaaaactttgaaaccatggaacgaaggcgtt
gtggggttccattcagagccgatacatcagcatgagtggtggaacaagccacggagacttgaggagctg
gcagggcagagcctgctgaaggatgagggcctggccattgcccgcctggagttgctgccagggagctct
tccgccactcttcatggcagcctttgacgggagacacagccagaccctgaaggcaatggtgcagggcctg
gcccttcaactgectccctctgggagtgctgatgaagggacaacatcttcaactggagacctcaaagct
gtgcttgatggacttgatgtgctccttgcccaggaggttcgccccaggaggtggaaacttcaagtgctgg
atctacggaagaactctcatcaggacttctggactgtatggtctggaaacagggccagctctgactcatt
tccagagccagaagcagctcagcccatgacaaagaagcgaagtagatggtttgagcacagaggcagag
cagcccttcatccagtagaggtgctcgtagacctgttccctcaaggaaggtgcctgtgatgaattgttct
ctacctcattgagaaagtgaagcgaagaaaaatgtactacgctgtgctgtaagaagctgaagatttt
tgcaatgcccatgcaggatataagatgatcctgaaaatggtgcagctggactctattgaagattggaa
gtgacttgacctggaagctaccaccttggcgaaatttctccttacctgggccagatgattaatctgc
gtagactcctcctctcccacatccatgcatcttctacatttccccggagaaggaagagcagtatatcgc
ccagttcacctctcagttcctcagctctgcagtgctgcaggctctctatgtggactctttatcttctt
agagggcgcctggatcagttgctcaggcacgtgatgaacccttggaaaccctctcaataactaactgcc
ggctttcggaaaggggatgtgatgcatctgtcccagagtcacagcgtcagtcagctaaagtgcctgagctc
aagtggggtcatgctgaccgatgtaagtcccagaccctccaagctctgctggagagagcctctgccacc
ctccaggacctggtctttgatgagtggtggatcacggatgatcagctccttgccctcctgectccctga
gccactgctcccagcttacaaccttaagcttctacgggaatccatctccatctctgccttgccagagctc
cctgcagcaectcatcgggctgagcaatctgaccacgtgctgtatcctgtccccctggagagttatgag
gacatccatggtaccctccaactggagaggttgccatctgcatgccaggctcagggagttgctgtgtg
agttggggcggccagcatggtctggcttagtgccaaccctgtcctcactgtggggacagaaccttcta
tgaccggagcccatcctgtgccctgtttcatgectaac

SEC ID N.º: 4

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS EJEMPLO 2

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFL
DGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSRRLVEL

AGQSLLKDEALIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLETFA
VLDGLDVLLAQEVRPRRWKLVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMTKKRKVDGLSTEAE
QPFIPVEVLVDFLKEGACDELFSYLIEKVKRKKNVLRCLCKKLIKIFAMPQDIKMILKMQVQLDSIEDLE
VTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRRLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFL
RGRDQLLRHVMNPLETLSITNCRLSEGDVMHLSQSPSVSQLSVLSLSGVMLTDVSPEPLQALLERASAT
LQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSFYGNSISISALQSLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
DIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

SEC ID N.º:5

Secuencia de ADN para ejemplo 3

atggatccaagcagccattcatcaaatatggcgaatacccaaatagaaatcagacaaaatcattattgctc
accgtgggtgctagcgggttatttaccagagcatagcttagaatctaaagcacttgcggttgcacaacaggc
tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggctggttagtggttattcacgatcactttta
gatggcttgactgatgttgcgaaaaattcccacatcgatcatcgtaaatggcggcttactatgtcatcg
actttacctaaaagaaattcaaagtttagaaatgacagaaaactttgaaacctggaacgaaggcgttt
gtgggggttccattcagagccgatacatcagcatgagtggtggacaagcccacggagacttgtggagctg
gcagggcagagcctgctgaaggatgaggccctggccattgccgccctggagtgtgctgccagggagctct
tcccggcactcttcatggcagcctttgacgggagacacagccagaccctgaaggcaatggtgcaggcctg
gcccttcacctgcctccctctgggagtgctgatgaagggaacaacatcttcacctggagaccttcaaagct
gtgcttgatggacttgatgtgctccttgcccaggaggttcgccccaggaggtggaaacttcaagtgtgg
atftacggaagaactctcatcaggacttctggactgtatggctctggaaacagggccagtctgtactcatt
tccagagccagaagcagctcagcccatgacaaagaagcgaaaagtagatggtttgagcacagagggcagag
cagcccttcatccagtagaggtgctcgtagacctgttccctcaaggaaggtgcctgtgatgaattgttct
cctacctcattgagaaagtgaagcgaaagaaaaatgtactacgcctgtgctgtaagaagctgaagatttt
tgcaatgcccatgcaggatatcaagatgatcctgaaaatgggtgcagctggactctattgaagatttggaa
gtgacttgtacctggaagctaccaccttggcgaatttctccttacctgggcccagatgattaatctgc
gtagactcctcctctcccacatccatgcatcttccctacatttccccggagaaggaagagcagtatatcg
ccagttcacctctcagttcctcagctcgcagtgccctgcaggtctctatgtggactctttatttttccct
agaggccgctggatcagttgctcaggcacgtgatgaaccccttggaaaccctctcaataactaactgcc
ggcttctggaaggggatgtgatgcatctgtcccagagctcccagcgtcagtcagctaagtgtcctgagctc
aagtgggggtcatgctgaccgatgtaagtcccagagccctccaagctctgctggagagagcctctgccacc
ctccaggacctggctcttgatgagtggtgggatcacggatgatcagctccttgccctcctgccttccctga
gccactgctcccagcttacaaccttaagcttctacgggaatccatctccatatctgccttgcagagctc
cctgcagcacctcatcgggctgagcaatctgacccacgtgctgtatcctgtccccctggagagttatgag
gacatccatggtaccctccacctggagaggcttgccctatctgcatgccaggctcagggagtgtctgtgtg
agtggggggcggcccagcatggctctggcttagtgccaacccctgtcctcactgtggggacagaaccttcta
tgaccgggagcccatcctgtgccctgtttcatgcctaacctcgagcaccaccaccaccacc

SEC ID N.º: 6

Secuencia de aminoácidos: para ejemplo 3

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRVVIHDHFL
DGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSRRLVEL
AGQSLLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLET FKA
VLDGLDVLLAQEVRRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMTKRKRKVDGLSTEAE
QPFIPVEVLVDLFLKEGACDELPSYLIEKVKRKKNVLRRLCCKKIKIFAMPQDIKMILKMVQLDSIEDLE
VTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRRLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFL
RGRDQLLRHVMPLETLSITNCRLSEGDVMHLSQSPSVLSVLSLGVMLTDVSPPEPLQALLERASAT
LQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSFYGNSISISALQSLLOHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
DIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTPYDPEPILCPCFMPNLEHHHHHH

SEC ID N.º: 7.

Secuencia de ADN para ejemplo 4:

atggatccaagcagccattcatcaaataatggcgaatacccaaatagaaatcagacaaaatcattattgctc
accgtggtgctagcgggtatttaccagagcatacgttagaatctaaagcacttgcggttgccacaacaggc
tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggctcggttagtggttattcacgatcacttttta
gatggcttgactgatgttgcgaaaaaattcccacatcgatcatcgtaaagatggccggttactatgtcatcg
actttaccttaaagaaaattcaaagttagaaatgacagaaaactttgaaacatggaacgaaggcggtt
gtgggggttccattcagagccgatacatcagcatgagtggtggaagaagcccaaggagacttgaggagctg
gcagggcagagcctgctgaaggatgaggccctggccattgccgccctggagttgctgccagggagctct
tcccgccactctcatggcagcctttgacgggagacacagccagaccctgaaggcaatggtgcaggcctg
gccttcacctgcctccctctgggagtgctgatgaagggaacaacatcttcacctggagacctcaaagct
gtgcttgatggacttgatgtgctccttgcccaggaggttcgccccaggaggtggaaacttcaagtgtgg
atctacggaagaactctcatcaggacttctggactgtatggcttggaacagggccagctctgtactcatt
tccagagccagaagcagctcagcccatgacaaagaagcgaagaagtagatgggttgagcacagaggcagag
cagccctcattccagtagaggtgctcgtagacctgttcccaaggaaggtgctgtgatgaattgttct
cctacctcattgagaaagtgaagcgaagaagaaaatgtactacgctgtgctgaagaagctgaagatttt
tgcaatgcccatgcaggatcaagatgatcctgaaaatgggtgcagctggactctattgaagatttgaa
gtgacttgtagcctggaagctaccacacctggcgaaaatcttctccttacctgggcccagatgattaactgc
gtagactcctcctctcccacatccatgcatcttctacatttccccggagaaggaagagcagtatatcgc
ccagttcacctctcagttcctcagctcgcagtgctgcagctctctatgtggactctttatcttctct
agagggccgctggatcagttgctcaggcacgtgatgaacccttggaaccctctcaataactaactgcc
ggcttccggaaggggatgtgatgcatctgtcccagagctcccagcgtcagtcagctaaagtgtcctgagct
aagtggggatcatgctgaccgatgtaagtcccagagccctccaagctctgctggagagagcctctgccacc
ctccaggacctggctcttgatgagtggtggatcacggatgatcagctccttgccctcctgcctcctga
gccactgctcccagcttacaaccttaagcttctacgggaattccatctccatctgccttgagagctct
cctgcagcactcatcgggctgagcaatctgaccacagtgctgtatcctgtccccctggagagttatgag
gacatccatggtaccctccacctggagaggcttgccatctgcatgccaggctcagggagttgctgtgtg
agttggggcggcccagcatggtctggcttagtgccaacctctgctcactgtggggacagaaccttcta
tgaccggagcccatcctgtgccctgttcatgcctaac

SEC ID N.º: 8

5 Secuencia de aminoácidos para ejemplo 4

MDPSSHSSNMANTQMKSDKI I IAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFL
DGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMERRRLWGS IQSRYISMSVWTSRRLVEL
AGQSLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLET FKA
VLDGLDVLQAQEVRRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWVSGNRASLYSFPEPEAAQPMTKRKRKVDGLSTEA
QPFIPVEVLVDLFLKEGACDELFSYLI EKVKRKNVLRCLCKKIKIFAMPMDIKMILKMVQLDSIEDLE
VTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRRLLSHIIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFL
RGRLDQLLRHVMNPLETLSITNCRSLSEGDMHLSQSPSVLSVLSLSGVMLTDVVSPEPLQALLERASAT
LQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSTFYGNSSISALQSLLOHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
DIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

SEC ID N.º: 11

Secuencia de ADN de codón optimizado para ejemplo 4a

atggatccaagcagccattcatcaaataatggcgcaataccctaaatgaaatcagacaaaatcattattgctc
accgtggtgctagcggttatccaccagagcatacgttagaatctaaagcacttgcggttgacacaacaggc
tgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggctcggttagtggttattcacgatcactttta
gatggcttgactgatggtgacgaaaaatccacacatcgatcgtaaaagatggccgttactatgtcatcg
acttaccttaaaagaaattcaaagtttagaaatgacagaaaaacttgaaaccatggaacgtcgctcgctc
gtggggcagcattcagagccgttatattagcatgagcgtgtggaccagcccgcgtcgctcggttgagctg
gccggccagagcctgctgaaagatgaagcgtggccattgcccgcgtggagctgctgccgcgtgagctgt
ttccgccgctggttatggcggcgttgatggcgtcatagccagaccctgaaagcgtggtgcagggcgtg
gccgttacctgtctgccgctggcgtgctgatgaaaggccagcattgcatctggaaaccttaaaagc
gtgctggatggcctggatgtgctgctggcccaggaagttcgccgcgtcggtggaaactgcaagtgtgg
atctgcgtaaaaacagccatcaggattttggaccgctgtggagcggcaatcgctgcgagcctgtatagctt
tccggaaccggaagcggcgcagccgatgaccaaaaaacgtaaaaggatggcctgagcaccgaagcggaa
cagccgtttatccgggtggaagtgtggttgacctgtttctgaaagaaggcgcctgcgacgagctgttta
gctatctgatcgaaaaagtgaacgcaaaaaaacgtgctgctgctgctgcaaaaaactgaaaatctt
cgcgatgccgatgcaggatattaaaatgatcctgaaaatggtgcagctggatagcattgaggacctggaa
gtgacctgcacctggaaactgccgacctggccaaatttagcccgtatctgggcccagatgattaacctgc
gtcgtctgctgctgtctcatattcatgagcagcgtatattagcccggaaaaagaagaacagtatatcgc
gcagtttaccagccagtttctgagcctgcaatgacctgcaagcgtgtatgtggatagcctgtttttctg
cgtggccgtctggatcagctgctgctcatgtgatgaatccgctggaaacctgagcattaccaactgcc
gtctgagcgaaggcgtgtgatgcatctgagccagagcccagcgttagccagctgtctgtctgagcct
gagcggcgtgatgctgaccgatgtgagcccgaaccgctgcaagccctgctggaacgtgcgagcgcgacc
ctgcaagacctggtgtttgatgaatgcccattaccgatgatcagctgctggccctgctgccgagcctga
gccattgcagccagctgaccacctgagcttttatggcaacagcattagcattagcgcgctgcaaaacct
gctgcaacatctgattggcctgagcaacctgacctatgtgctgtatccggtgccgctggaaagctatgaa
gatattcatggcaccctgcatctggaacgtctggcctatctgcacgcgctctgctgagctgctgtgag
agctgggcccgtccgagcattggtttggctgctgcaatccgtgcccgcattgcccgcgatcgtacctttta
tgatccggaaccgattctgtgcccgtgctttatgccgaac

SEC ID N.º: 12

5 Secuencia de aminoácidos para ejemplo 4a

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFL
DGLTDVAKKFPHRHRKDRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMERRRLWGSIQSRYISMSVWTSRRLVEL
AGQSLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLKMGQHLHLET FKA
VLDGLDVLQAQEVPRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPPEPEAAQPMTKKRKVDGLSTEAE
QFFIPVEVLVDLFLKEGACDELFSYLIKVKRKNVLRCLCKKLLKIFAMPMDIKMILKMQVLDLSDIEDLE
VTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRRLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFL
RGRRLDQLLRHVMNPLETSLITNCRLESGDVMHLSQSPSVSLSVLSLSGVMLTDVSPPEPLQALLERASAT
LQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSPFYGNSSISALQSLQLHLIGLSNLTHVLYPVPLESYE
DIHGTLLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A.
- 5 <120> Vacuna
- <130> VB62293
- <150> 0700760.2
- 10 <151> 15-1-2007
- <150> 0701262.8
- <151> 23-1-2007
- 15 <160> 45
- <170> FastSEC para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 1887
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME – TSGHHHHHH (plásmido TCMP14)

ES 2 393 812 T3

<400> 1

```

atggatccaa gcagccatc atcaaatatg gcgaatacco aaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180
cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa accatggaac gaaggcggtt gtgggggtcc 360
attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact tgtggagctg 420
gcagggcaga gcctgctgaa ggatgaggcc ctggccattg ccgccctgga gttgctgccc 480
agggagctct tcccgccact cttcatggca gcctttgacg ggagacacag ccagaccctg 540
aaggcaatgg tgcaggcctg gcccttcacc tgcctcctc tgggagtgt gatgaaggga 600
caacatcttc acctggagac cttcaaagct gtgcttgatg gacttgatgt gctccttgcc 660
caggaggttc gcccagggag gtggaaactt caagtgtctg atttacggaa gaactctcat 720
caggacttct ggactgtatg gtctggaaac agggccagtc tgtactcatt tccagagcca 780
gaagcagctc agcccatgac aaagaagcga aaagtagatg gtttgagcac agaggcagag 840

cagcccttca ttccagtaga ggtgctcgtc gacctgttcc tcaaggaagg tgccctgtgat 900
gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaga aaaatgtact acgcctgtgc 960
tgtaagaagc tgaagatttt tgcaatgcc atgcaggata tcaagatgat cctgaaaatg 1020
gtgcagctgg actctattga agatttgaa gtgacttgta cctggaagct acccaccttg 1080
gcgaaatctt ctccttacct gggccagatg attaatctgc gtagactcct cctctccac 1140
atccatgcat cttcctacat ttccccggag aaggaagagc agtatatcgc ccagttcacc 1200
tctcagttcc tcagtctgca gtgcctgcag gctctctatg tggactcttt attttctct 1260
agagggcgcc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ccttggaaac cctctcaata 1320
actaactgcc ggctttcgga aggggatgtg atgcactgtt cccagagctc cagcgtcagt 1380
cagctaagtg tctgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtcc cgagcccctc 1440
caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggctcttga tgagtgtggg 1500
atcacggatg atcagctcct tgccctcctg ccttcctga gccactgctc ccagcttaca 1560
accttaagct tctacgggaa ttccatctcc atatctgcct tgcagagtct cctgcagcac 1620
ctcatcgggc tgagcaatct gacccacgtg ctgtatcctg tccccctgga gagttatgag 1680
gacatccatg gtacctcca cctggagagg cttgcctatc tgcattgccag gctcagggag 1740
ttgctgtgtg agttggggcg gccagcatg gtctggctta gtgccaacct ctgtcctcac 1800
tgtggggaca gaaccttcta tgaccggag cccatcctgt gccctgttt catgcctaac 1860
actagtggcc accatcacca tcacat                                     1887

```

- 5 <210> 2
- <211> 629
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

10 <220>

ES 2 393 812 T3

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME – TSGHHHHHH (plásmido TCMP14)

<400> 2

```

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

```

ES 2 393 812 T3

	115						120						125			
Ser	Val	Trp	Thr	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Ser	
	130						135						140			
Leu	Leu	Lys	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro	
145					150					155					160	
Arg	Glu	Leu	Phe	Pro	Pro	Leu	Phe	Met	Ala	Ala	Phe	Asp	Gly	Arg	His	
				165					170					175		
Ser	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Met	Val	Gln	Ala	Trp	Pro	Phe	Thr	Cys	Leu	
			180					185					190			
Pro	Leu	Gly	Val	Leu	Met	Lys	Gly	Gln	His	Leu	His	Leu	Glu	Thr	Phe	
	195						200					205				
Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Glu	Val	Arg	
	210					215					220					
Pro	Arg	Arg	Trp	Lys	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Arg	Lys	Asn	Ser	His	
225					230					235					240	
Gln	Asp	Phe	Trp	Thr	Val	Trp	Ser	Gly	Asn	Arg	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser	
				245				250						255		
Phe	Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Ala	Gln	Pro	Met	Thr	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	
			260					265					270			
Asp	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu	Gln	Pro	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Val	
	275						280					285				
Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Cys	Asp	Glu	Leu	Phe	Ser	
	290					295					300					
Tyr	Leu	Ile	Glu	Lys	Val	Lys	Arg	Lys	Lys	Asn	Val	Leu	Arg	Leu	Cys	
305					310					315					320	
Cys	Lys	Lys	Leu	Lys	Ile	Phe	Ala	Met	Pro	Met	Gln	Asp	Ile	Lys	Met	
				325						330				335		
Ile	Leu	Lys	Met	Val	Gln	Leu	Asp	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu	Glu	Val	Thr	
			340					345					350			
Cys	Thr	Trp	Lys	Leu	Pro	Thr	Leu	Ala	Lys	Phe	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	
	355						360					365				
Gln	Met	Ile	Asn	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	His	Ala	Ser	
	370					375					380					
Ser	Tyr	Ile	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Gln	Phe	Thr	
385					390					395					400	
Ser	Gln	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Val	Asp	Ser	
			405						410					415		
Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Arg	His	Val	Met	
			420					425					430			
Asn	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Glu	Gly	
	435						440					445				
Asp	Val	Met	His	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Ser	Val	
	450					455					460					
Leu	Ser	Leu	Ser	Gly	Val	Met	Leu	Thr	Asp	Val	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	

ES 2 393 812 T3

<400> 3

```

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
cttgcgtttg caccaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggg 180
cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccggtac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagttag aaatgacaga aaactttgaa accatggaac gaaggcgttt gtggggttcc 360
attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact tgtggagctg 420
gcagggcaga gcctgctgaa ggatgaggcc ctggccattg ccgccctgga gttgctgcc 480
agggagctct tcccgccact cttcatggca gcctttgacg ggagacacag ccagaccctg 540
aaggcaatgg tgcaggcctg gcccttcacc tgccctcctc tgggagtgtc gatgaagga 600
caacatcttc acctggagac cttcaaagct gtgcttgatg gacttgatgt gctccttgcc 660

caggaggttc gccccaggag gtggaaactt caagtgtggtg atttacggaa gaactctcat 720
caggacttct ggactgtatg gtctggaaac agggccagtc tgtactcatt tccagagcca 780
gaagcagctc agcccatgac aaagaagcga aaagtagatg gtttgagcac agaggcagag 840
cagcccttca ttccagtaga ggtgctcgta gacctgttcc tcaaggaagg tgcctgtgat 900
gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaga aaaatgtact acgcctgtgc 960
tgtaagaagc tgaagathtt tgcaatgcc atgcaggata tcaagatgat cctgaaaatg 1020
gtgcagctgg actctattga agathtggaa gtgacttgta cctggaagct acccaccttg 1080
gcgaaathtt ctcttacct gggccagatg attaactctg gtagactcct cctctcccac 1140
atccatgcat ctctctacat tccccggag aaggaagagc agtatatcgc ccagttcacc 1200
tctcagttcc tcagtctgca gtgcctgcag gctctctatg tggactcttt attttctctt 1260
agaggccgcc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ccttggaaac cctctcaata 1320
actaactgcc ggctttcgga aggggatgtg atgcatctgt cccagagtec cagcgtcagt 1380
cagctaagtg tcttgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtcc cgagcccctc 1440
caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggctcttga tgagtgtggg 1500
atcacggatg atcagctcct tgccctcctg ccttccctga gccactgctc ccagcttaca 1560
accttaagct tctacgggaa ttccatctcc atatctgcct tgcagagtct cctgcagcac 1620
ctcatcgggc tgagcaatct gaccacgtg ctgtatcctg tccccctgga gagttatgag 1680
gacatccatg gtaccctcca cctggagagg cttgcctatc tgcattgccag gctcagggag 1740
ttgctgtgtg agttggggcg gccagcatg gtctggctta gtgccaaacc ctgtcctcac 1800
tgtggggaca gaaccttcta tgaccggag cccatcctgt gccctgttt catgcctaac 1860

```

<210> 4

5 <211> 620

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - sin marca de His (plásmido TCMP14)

ES 2 393 812 T3

<400> 4

```

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

```

ES 2 393 812 T3

Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met
 100 105 110
 Glu Arg Arg Arg Leu Trp Gly Ser Ile Gln Ser Arg Tyr Ile Ser Met
 115 120 125
 Ser Val Trp Thr Ser Pro Arg Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln Ser
 130 135 140
 Leu Leu Lys Asp Glu Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Glu Leu Leu Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Leu Phe Pro Pro Leu Phe Met Ala Ala Phe Asp Gly Arg His
 165 170 175
 Ser Gln Thr Leu Lys Ala Met Val Gln Ala Trp Pro Phe Thr Cys Leu
 180 185 190
 Pro Leu Gly Val Leu Met Lys Gly Gln His Leu His Leu Glu Thr Phe
 195 200 205
 Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu Ala Gln Glu Val Arg
 210 215 220
 Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln Val Leu Asp Leu Arg Lys Asn Ser His
 225 230 235 240
 Gln Asp Phe Trp Thr Val Trp Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Tyr Ser
 245 250 255
 Phe Pro Glu Pro Glu Ala Ala Gln Pro Met Thr Lys Lys Arg Lys Val
 260 265 270
 Asp Gly Leu Ser Thr Glu Ala Glu Gln Pro Phe Ile Pro Val Glu Val
 275 280 285
 Leu Val Asp Leu Phe Leu Lys Glu Gly Ala Cys Asp Glu Leu Phe Ser
 290 295 300
 Tyr Leu Ile Glu Lys Val Lys Arg Lys Lys Asn Val Leu Arg Leu Cys
 305 310 315 320
 Cys Lys Lys Leu Lys Ile Phe Ala Met Pro Met Gln Asp Ile Lys Met
 325 330 335
 Ile Leu Lys Met Val Gln Leu Asp Ser Ile Glu Asp Leu Glu Val Thr
 340 345 350
 Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu Gly
 355 360 365
 Gln Met Ile Asn Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala Ser
 370 375 380
 Ser Tyr Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe Thr
 385 390 395 400
 Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp Ser
 405 410 415
 Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val Met
 420 425 430
 Asn Pro Leu Glu Thr Leu Ser Ile Thr Asn Cys Arg Leu Ser Glu Gly
 435 440 445

ES 2 393 812 T3

```

Asp Val Met His Leu Ser Gln Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val
 450                      455                      460
Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu
465                      470                      475                      480
Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe
                      485                      490                      495
Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser
                      500                      505                      510
Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser
                      515                      520                      525
Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
 530                      535                      540
Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu
545                      550                      555                      560
Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala
                      565                      570                      575
Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp
                      580                      585                      590
Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp
                      595                      600                      605
Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn
 610                      615                      620

```

<210> 5

<211> 1884

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME – LEHHHHHH (plásmido pET21)

10

ES 2 393 812 T3

<400> 5

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aaatgaaatc agacaaaatc 60
 attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgtaga atctaaagca 120
 cttgcgtttg cacaaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180
 cgtttagtgg ttattcacga tcaactttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaattc 240
 ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
 caaagttagg aaatgacaga aaactttgaa accatggaac gaaggcgttt gtgggggtcc 360
 attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact tgtggagctg 420
 gcagggcaga gcctgctgaa ggatgaggcc ctggccattg ccgccctgga gttgctgccc 480
 agggagctct tcccgccact cttcatggca gcctttgacg ggagacacag ccagaccctg 540
 aaggcaatgg tgcaggcctg gcccttcacc tgcctcctc tgggagtgtc gatgaagggg 600

caacatcttc acctggagac cttcaaagct gtgcttgatg gacttgatgt gctccttgcc 660
 caggaggttc gccccaggag gtggaaactt caagtgtctg atttacggaa gaactctcat 720
 caggacttct ggactgtatg gtctggaaac agggccagtc tgtactcatt tccagagcca 780
 gaagcagctc agcccatgac aaagaagcga aaagtagatg gtttgagcac agaggcagag 840
 cagcccttca ttccagtaga ggtgctcgtg gacctgttcc tcaaggaagg tgcctgtgat 900
 gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaga aaaatgtact acgcctgtgc 960
 tgtaagaagc tgaagathtt tgcaatgccc atgcaggata tcaagatgat cctgaaaatg 1020
 gtgcagctgg actctattga agatttgaa gtgacttgta cctggaaget acccacttg 1080
 gcgaaathtt ctccctacct gggccagatg attaactctg gtagactcct cctctcccac 1140
 atccatgcat cttcctacat ttccccggag aaggaagagc agtatatcgc ccagttcacc 1200
 tctcagttcc tcagtctgca gtgcctgcag gctctctatg tggactcttt attttctctt 1260
 agagggccgc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ccttggaaac cctctcaata 1320
 actaactgcc ggctttcgga aggggatgtg atgcatctgt cccagagtec cagcgtcagt 1380
 cagctaagtg tcttgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtec cgagccctc 1440
 caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggctcttga tgagtgtggg 1500
 atcacggatg atcagctcct tgccctctg ccttcctga gccactgctc ccagcttaca 1560
 accttaagct tctacgggaa ttccatctcc atatctgctt tgcaagatct cctgcagcac 1620
 ctcatcgggc tgagcaatct gacccacgtg ctgtatctct tccccctgga gagttatgag 1680
 gacatccatg gtaccctcca cctggagagg cttgcctatc tgcatgccag gctcagggag 1740
 ttgctgtgtg agttggggcg gccagcatg gtctggctta gtgccaaacc ctgtcctcac 1800
 tgtggggaca gaaccttcta tgacccggag cccatctctg gccctgttt catgcctaac 1860
 ctgagcacc accaccacca ccac 1884

<210> 6

5 <211> 628

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME – LEHHHHHH (plásmido pET21)

ES 2 393 812 T3

<400> 6

```

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

```

ES 2 393 812 T3

				85						90					95
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Met
				100						105					110
Glu	Arg	Arg	Arg	Leu	Trp	Gly	Ser	Ile	Gln	Ser	Arg	Tyr	Ile	Ser	Met
				115						120					125
Ser	Val	Trp	Thr	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Ser
				130											140
Leu	Leu	Lys	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro
145						150					155				160
Arg	Glu	Leu	Phe	Pro	Pro	Leu	Phe	Met	Ala	Ala	Phe	Asp	Gly	Arg	His
				165							170				175
Ser	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Met	Val	Gln	Ala	Trp	Pro	Phe	Thr	Cys	Leu
				180							185				190
Pro	Leu	Gly	Val	Leu	Met	Lys	Gly	Gln	His	Leu	His	Leu	Glu	Thr	Phe
				195											205
Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Glu	Val	Arg
				210											220
Pro	Arg	Arg	Trp	Lys	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Arg	Lys	Asn	Ser	His
225						230						235			240
Gln	Asp	Phe	Trp	Thr	Val	Trp	Ser	Gly	Asn	Arg	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser
				245											255
Phe	Pro	Glu	Pro	Glu	Ala	Ala	Gln	Pro	Met	Thr	Lys	Lys	Arg	Lys	Val
				260											270
Asp	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu	Gln	Pro	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Val
				275											285
Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Ala	Cys	Asp	Glu	Leu	Phe	Ser
				290											300
Tyr	Leu	Ile	Glu	Lys	Val	Lys	Arg	Lys	Lys	Asn	Val	Leu	Arg	Leu	Cys
305						310						315			320
Cys	Lys	Lys	Leu	Lys	Ile	Phe	Ala	Met	Pro	Met	Gln	Asp	Ile	Lys	Met
				325											335
Ile	Leu	Lys	Met	Val	Gln	Leu	Asp	Ser	Ile	Glu	Asp	Leu	Glu	Val	Thr
				340											350
Cys	Thr	Trp	Lys	Leu	Pro	Thr	Leu	Ala	Lys	Phe	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly
				355											365
Gln	Met	Ile	Asn	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	His	Ala	Ser
				370											380
Ser	Tyr	Ile	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Gln	Phe	Thr
385						390									400
Ser	Gln	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Val	Asp	Ser
				405											415
Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Arg	His	Val	Met
				420											430
Asn	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Glu	Gly

ES 2 393 812 T3

```

          435                440                445
Asp Val Met His Leu Ser Gln Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val
  450                455                460
Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu
  465                470                475                480
Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe
          485                490                495
Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser
          500                505                510
Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser
          515                520                525
Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
  530                535                540
Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu
  545                550                555                560
Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala
          565                570                575
Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp
          580                585                590
Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp
          595                600                605
Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn Leu Glu His His
  610                615                620
His His His His
  625

```

<210> 7

<211> 1860

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - sin marca de His(plásmido pET21)

10 <400> 7

15

ES 2 393 812 T3

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaatacco aatgaaatc agacaaaatc 60
 attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
 cttgcgtttg cacacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180
 cgtttagtgg ttattcacga tcaactttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
 ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
 caaagttag aatgacaga aaactttgaa accatggaac gaaggcgtt gtgggggtcc 360
 attcagagcc gatacatcag catgagtgtg tggacaagcc cacggagact tgtggagctg 420

gcagggcaga gcctgctgaa ggatgaggcc ctggccattg ccgccctgga gttgctgccc 480
 agggagctct tcccgccact cttcatggca gcctttgacg ggagacacag ccagaccctg 540
 aaggcaatgg tgcaggcctg gcccttcacc tgccctcctc tgggagtgtc gatgaaggga 600
 caacatcttc acctggagac cttcaaagct gtgcttgatg gacttgatgt gctccttgcc 660
 caggaggttc gccccaggag gtggaaactt caagtgtctg atttacggaa gaactctcat 720
 caggacttct ggactgtatg gtctggaaac agggccagtc tgtactcatt tccagagcca 780
 gaagcagctc agcccatgac aaagaagcga aaagtagatg gtttgagcac agaggcagag 840
 cagcccttca ttccagtaga ggtgctcgta gacctgttcc tcaaggaagg tgccctgtgat 900
 gaattgttct cctacctcat tgagaaagtg aagcgaaaga aaaatgtact acgcctgtgc 960
 tgtaagaagc tgaagatfff tgcaatgccc atgcaggata tcaagatgat cctgaaaatg 1020
 gtgcagctgg actctattga agatttggaa gtgacttgta cctggaagct acccaccttg 1080
 gcgaaatfff ctcttacct gggccagatg attaactctg gtagactcct cctctcccac 1140
 atccatgcat ctctctacat ttccccggag aaggaagagc agtatatcgc ccagttcacc 1200
 tctcagttcc tcagtctgca gtgcctgcag gctctctatg tggactcttt atttttcctt 1260
 agaggccgcc tggatcagtt gctcaggcac gtgatgaacc ccttggaaac cctctcaata 1320
 actaactgcc ggctttcggg aggggatgtg atgcatctgt cccagagtcc cagcgtcagt 1380
 cagctaagtg tcttgagtct aagtggggtc atgctgaccg atgtaagtcc cgagcccctc 1440
 caagctctgc tggagagagc ctctgccacc ctccaggacc tggctcttga tgagtgtggg 1500
 atcacggatg atcagctcct tgccctcctg ccttcctga gccactgctc ccagcttaca 1560
 accttaagct tctacgggaa ttccatctcc atatctgect tgcaagatct cctgcagcac 1620
 ctcatcgggc tgagcaatct gaccacgtg ctgtatctg tccccctgga gagttatgag 1680
 gacatccatg gtacctcca cctggagagg cttgcctatc tgcatgccag gctcaggag 1740
 ttgctgtgtg agttggggcg gccagcatg gtctggctta gtgccaaacc ctgtcctcac 1800
 tgtggggaca gaaccttcta tgaccggag cccatctgt gccctgttt catgcctaac 1860

<210> 8

<211> 620

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - sin marca de His(plásmido pET21)

10

ES 2 393 812 T3

<400> 8

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5					10					15	
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
			20					25					30		
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
		35					40					45			
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
	50						55					60			

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

ES 2 393 812 T3

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaatacc aaatgaaatc agacaaaatc 60
 attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
 cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180
 cgtttagtgg ttattcacga tcaactttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaattc 240
 ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
 caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa accatggaac gtcgtcgtct gtggggcagc 360

attcagagcc gttatattag catgagcgtg tggaccagcc cgcgtcgtct ggttgagctg 420
 gccggccaga gcctgctgaa agatgaagcg ctggccattg cggcgctgga gctgctgccg 480
 cgtgagctgt ttccgccgct gtttatggcg gcgtttgatg gccgtcatag ccagaccctg 540
 aaagcgatgg tgcaggcgtg gccgtttacc tgtctgccgc tgggcgtgct gatgaaaggc 600
 cagcatctgc atctggaac cttaaagcg gtgctggatg gcctggatgt gctgctggcc 660
 caggaagttc gtccgcgtcg ttgaaaactg caagtgctgg atctgcgtaa aaacagccat 720
 caggattttt ggaccgtgtg gagcggcaat cgtgcgagcc tgtatagctt tccggaaccg 780
 gaagcggcgc agccgatgac caaaaaactg aaagtggatg gcctgagcac cgaagcggaa 840
 cagccgttta ttccgggtgga agtgctggtt gacctgttcc tgaagaaggc cgccctgcgac 900
 gagctgttta gctatctgat cgaaaaagtg aaacgcaaaa aaaacgtgct gegtctgtgc 960
 tgcaaaaaac tgaaaatctt cgcgatgccg atgcaggata ttaaatgat cctgaaaatg 1020
 gtgcagctgg atagcattga ggacctgaa gtgacctgca cctggaaact gccgacctg 1080
 gccaaattta gcccgatctc gggccagatg attaacctgc gtcgtctgct gctgtctcat 1140
 attcatgcca gcagctatat tagcccggaa aaagaagaac agtatatcgc gcagtttacc 1200
 agccagtttc tgagcctgca atgcctgcaa gcgctgtatg tggatagcct gtttttctg 1260
 cgtggccgctc tggatcagct gctgcgtcat gtgatgaatc cgctggaaac cctgagcatt 1320
 accaactgcc gtctgagcga aggcgatgtg atgcatctga gccagagccc gagegttagc 1380
 cagctgtctg ttctgagcct gagcggcgtg atgctgaccg atgtgagccc ggaaccgctg 1440
 caagccctgc tggaaactgc gagcgcgacc ctgcaagacc tgggtgttga tgaatgcggc 1500
 attaccgatg atcagctgct ggccctgctg ccgagcctga gccattgcag ccagctgacc 1560
 accctgagct tttatggcaa cagcattagc attagcgcgc tgcaaagcct gctgcaacat 1620
 ctgattggcc tgagcaacct gacctatgtg ctgtatccgg tgccgctgga aagctatgaa 1680
 gatattcatg gcacctgca tctggaactg ctggcctatc tgcaacgcgc tctgcgtgag 1740
 ctgctgtgcg agctgggccc tccgagcatg gtttggtgtg ctgcgaatcc gtgcccgcac 1800
 tgcggcgatc gtacctttta tgatccggaa ccgattctgt gcccgctgctt tatgccgaac 1860
 caccaccacc accaccac 1878

<210> 10

<211> 626

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - HHHHHH (plásmido pET26)

10

ES 2 393 812 T3

<400> 10

```
Met Asp Pro Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
 1           5           10           15
Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
          20           25           30
Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp
          35           40           45
Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
```

ES 2 393 812 T3

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

ES 2 393 812 T3

				405					410					415		
Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Leu	Arg	His	Val	Met	
				420				425					430			
Asn	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Asn	Cys	Arg	Leu	Ser	Glu	Gly	
				435				440					445			
Asp	Val	Met	His	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Val	Ser	Gln	Leu	Ser	Val	
				450				455				460				
Leu	Ser	Leu	Ser	Gly	Val	Met	Leu	Thr	Asp	Val	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	
465						470				475					480	
Gln	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ala	Ser	Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Leu	Val	Phe	
				485						490				495		
Asp	Glu	Cys	Gly	Ile	Thr	Asp	Asp	Gln	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Ser	
				500				505						510		
Leu	Ser	His	Cys	Ser	Gln	Leu	Thr	Thr	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ser	
				515				520					525			
Ile	Ser	Ile	Ser	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gln	His	Leu	Ile	Gly	Leu	
				530				535				540				
Ser	Asn	Leu	Thr	His	Val	Leu	Tyr	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ser	Tyr	Glu	
545						550				555					560	
Asp	Ile	His	Gly	Thr	Leu	His	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Tyr	Leu	His	Ala	
				565						570					575	
Arg	Leu	Arg	Glu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Gly	Arg	Pro	Ser	Met	Val	Trp	
				580						585				590		
Leu	Ser	Ala	Asn	Pro	Cys	Pro	His	Cys	Gly	Asp	Arg	Thr	Phe	Tyr	Asp	
				595				600					605			
Pro	Glu	Pro	Ile	Leu	Cys	Pro	Cys	Phe	Met	Pro	Asn	His	His	His	His	
				610				615					620			
His	His															
625																

<210> 11

<211> 1860

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - sin marca de His (plásmido pET26)

10 <400> 11

ES 2 393 812 T3

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180

cgtttagtgg ttattcacga tcaactttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
ccacategtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagtttag aatgacaga aaactttgaa accatggaac gtcgtcgtct gtggggcagc 360
attcagagcc gttatattag catgagcgtg tggaccagcc cgcgtcgtct ggttgagctg 420
gccggccaga gcctgctgaa agatgaagcg ctggccattg cggcgtgga gctgctgccg 480
cgtgagctgt ttccgcgct gtttatggcg gcgttgatg gccgtcatag ccagaccctg 540
aaagcgatgg tgcagggctg gccgtttacc tgtctgccgc tgggcgtgct gatgaaaggc 600
cagcatctgc atctggaaac ctttaaagcg gtgctggatg gcctggatgt gctgctggcc 660
caggaagtcc gtccgcgctg ttggaaactg caagtgctgg atctgcgtaa aaacagccat 720
caggattttt ggaccgtgtg gagcggcaat cgtgcgagcc tgtatagctt tccggaaccg 780
gaagcggcgc agccgatgac caaaaaactg aaagtggatg gcctgagcac cgaagcggaa 840
cagccgttta ttccggtgga agtgcgtggt gacctgttc tgaagaagg cgccctgcgac 900
gagctgttta gctatctgat cgaaaaagtg aaacgcaaaa aaaacgtgct gcgtctgtgc 960
tgcaaaaaac tgaaaatctt cgcgatgccg atgcaggata ttaaaatgat cctgaaaatg 1020
gtgcagctgg atagcattga ggacctggaa gtgacctgca cctggaaact gccgaccctg 1080
gccaaattta gcccgatatc gggccagatg attaacctgc gtcgtctgct gctgtctcat 1140
attcatgcga gcagctatat tagcccggaa aaagaagaac agtatatcgc gcagtttacc 1200
agccagtttc tgagcctgca atgcctgcaa gcgctgtatg tggatagcct gtttttctg 1260
cgtggccgctc tggatcagct gctgcgtcat gtgatgaatc cgtggaaac cctgagcatt 1320
accaactgcc gtctgagcga aggcgatgtg atgcatctga gccagagccc gagegttagc 1380
cagctgtctg ttctgagcct gagcggcgtg atgctgaccg atgtgagccc ggaaccgctg 1440
caagccctgc tggaaactgc gagcgcgacc ctgcaagacc tgggttttga tgaatgcggc 1500
attaccgatg atcagctgct ggccctgctg ccgagcctga gccattgcag ccagctgacc 1560
accctgagct tttatggcaa cagcattagc attagcgcgc tgcaaagcct gctgcaacat 1620
ctgattggcc tgagcaacct gacctatgtg ctgtatccgg tgcctgga aagctatgaa 1680
gatattcatg gcacctgca tctggaactg ctggcctatc tgcacgcgcg tctgcgtgag 1740
ctgctgtgcg agctgggccc tccgagcatg gtttgctgtg ctgcgaatcc gtgcccgcac 1800
tgccggcagc gtacctttta tgatccggaa ccgattctgt gcccgctgctt tatgccgaac 1860

<210> 12

<211> 620

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MDP- 20-127 - Proteína D - PRAME - sin marca de His (plásmido pET26)

10

ES 2 393 812 T3

<400> 12

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

ES 2 393 812 T3

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

ES 2 393 812 T3

Ser Tyr Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe Thr
 385 390 395 400
 Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp Ser
 405 410 415
 Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val Met
 420 425 430
 Asn Pro Leu Glu Thr Leu Ser Ile Thr Asn Cys Arg Leu Ser Glu Gly
 435 440 445
 Asp Val Met His Leu Ser Gln Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Gly Val Met Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu
 465 470 475 480
 Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe
 485 490 495
 Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser
 500 505 510
 Leu Ser His Cys Ser Gln Leu Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser
 515 520 525
 Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
 530 535 540
 Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu
 545 550 555 560
 Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala
 565 570 575
 Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp
 580 585 590
 Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp
 595 600 605
 Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn
 610 615 620

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

Val Leu Asp Gly Leu Asp Val Leu Leu
 1 5

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

Ser Leu Tyr Ser Phe Pro Glu Pro Glu Ala
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 15

Ala Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
 1 5 10

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 16

Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 17

Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
 1 5

30

<210> 18

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> oligonucleótido de polaridad positiva CAN008

<400> 18

atataacata tggatccaag cagccattca tcaaat 36

10

<210> 19

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN037

<400> 19

ccacaaaacgc ctcgtcca tggttcaaa gtttctgtc 40

20

<210> 20

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> oligonucleótido de polaridad positiva CAN036

<400> 20

gacagaaaac ttgaaacca tggaacgaag gogttgtgg 40

30

<210> 21

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN029

<400> 21

agagagacta gtctagttag gcatgaaaca ggggcacag 39

<210> 22

<211> 36

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN002

10

<400> 22

ggaggaacta gtgttaggca tgaaacaggg gcacag 36

<210> 23

<211> 36

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido de polaridad positiva CAN040

20

<400> 23

agagagcata tgagcagcca tcatcaaat atggcg 36

<210> 24

<211> 41

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN032

30

<400> 24

acgtggggcg ccgoggttc aaagtttct gtcatttcta a 41

<210> 25

<211> 39

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido de polaridad positiva CAN033

<400> 25

5

ttgtggcgg cgcgaatgga acgaaggcgt ttgtggggt 39

<210> 26

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN034

<400> 26

15

ggaggactcg aggttaggca tgaaacaggg gcacag 36

<210> 27

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN035

<400> 27

25

ggaggactcg agctagttag gcatgaaaca ggggcacag 39

<210> 28

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> oligonucleótido de polaridad positiva CAN106

<400> 28

35

cagaaaactt tgaaccatg gaaogaagge g 31

<210> 29

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN107

<400> 29

10

cgccctogtt ccatggttc aaagtttct g 31

<210> 30

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> oligonucleótido de polaridad positiva CAN104

<400> 30

20

ggagatatac atatggatcc aagcagccat tcatcaaata tgg 43

<210> 31

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN105

<400> 31

30

ccatattga tgaatggctg ctggatcca tatgtatc tcc 43

<210> 32

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> oligonucleótido de polaridad positiva CAN123

<400> 32

gacagaaaac ttgaaacca tggaacgtcg tegtctgtgg 40

<210> 33

<211> 40

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido CAN124

10

<400> 33

ccacagacga cgacgtcca tggttcaaa gtttctgtc 40

<210> 34

<211> 30

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido de polaridad positiva CAN199

20

<400> 34

ggaattccat atggatccaa gcagccattc 30

<210> 35

25 <211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> oligonucleótido antisentido CAN19

<400> 35

ggagctctcg agtcagtggg ggtgggtggg gtggttggc ataaagcaag ggc 53

<210> 36

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido inmunoestimulador CpG 1826

<400> 36

5 tccatgaogt tctgacggt 20

<210> 37

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> oligonucleótido inmunoestimulador CpG 1758

<400> 37

15 tctccagag tgcgcat 18

<210> 38

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> oligonucleótido inmunoestimulador CpG2006

<400> 38

25 aocgatgacg togccgggta oggcaccacg togtogtttt gtogttttgt cggt 54

<210> 39

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> oligonucleótido inmunoestimulador CpG1668

<400> 39

35 tccatgaogt tctgatgct 20

<210> 40

ES 2 393 812 T3

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> oligonucleótido inmunoestimulador CpG5456

<400> 40

tcgaogttt cggcgcgogc cg 22

10 <210> 41

<211> 111

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae* b

15 <400> 41

```

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

```

<210> 42

<211> 111

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 393 812 T3

<223> 1-Met, 2-Asp; 3-Pro; seguido por los aminoácidos 20 al 127 de la proteína D

<400> 42

```

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

```

5

<210> 43

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Proteína D-MAGE-A3-His

<400> 43

```

Met Asp Pro Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu
 1           5           10           15

```

15

20

ES 2 393 812 T3

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

ES 2 393 812 T3

```

Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu
  370                      375                      380
Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu Trp
385                      390                      395                      400
Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His His
                      405                      410                      415
Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu His
                      420                      425                      430
Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu Gly Gly His His His His His
                      435                      440                      445
His His
  450

```

<210> 44

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Los aminoácidos de la proteína D de *Haemophilus influenzae* para usar en una secuencia pDI/3-PRAME-His

10 <400> 44

```

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

```

25 <210> 45

<211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 393 812 T3

<220>

<223> Los aminoácidos de la proteína D de *Haemophilus influenzae* para usar en una secuencia pDI/3-MAGE-His

5 <400> 45

```

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

```

10

15

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende:
 - a) un antígeno tumoral PRAME;
 - b) una pareja de fusión heteróloga derivada de proteína D, en la que la proteína de fusión comprende los aminoácidos 20 a 127 de proteína D; y
 - c) adicionalmente aminoácidos Met-Asp-Pro en el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína de fusión, en la que la proteína de pareja de fusión heteróloga derivada de la proteína O (b) se funde con el N-terminal de PRAME.
2. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una marca de afinidad.
3. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la marca de afinidad es una marca de histidina.
4. Una proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente una o más secuencias de engarce entre la proteína pareja de fusión y PRAME; o entre la proteína pareja de fusión y una marca de afinidad; o entre PRAME y una marca de afinidad.
5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula huésped aislada transformada con el vector de la reivindicación 6.
8. Una vacuna que contiene una proteína de fusión o proteína pareja de fusión como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 5 o un vector como se reivindica en la reivindicación 6.
9. Una vacuna como se reivindica en la reivindicación 8 que comprende adicionalmente un coadyuvante, y/o citoquina o quimioquina inmunoestimuladora.
10. Una vacuna como se reivindica en la reivindicación 9 en la que el coadyuvante comprende 3D-MPL, QS21 y/o un oligonucleótido CpG.
11. Una vacuna como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para usar en medicina.
12. Uso de una proteína o ácido nucleico o vector de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de una vacuna para tratar inmunoterapéuticamente a un paciente que sufre de cáncer.
13. Un procedimiento para producir una proteína de fusión que comprende la etapa de expresar en una célula una proteína de fusión que comprende una proteína pareja de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la célula es una bacteria.
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la bacteria es *E. coli*.
16. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16 que comprende adicionalmente la etapa de lisar la célula y purificar la proteína de fusión expresada a partir de las células lisadas.
17. Una proteína de fusión obtenida mediante u obtenible mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 21 en la que el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón tal como NSCLC, sarcoma, cáncer ovárico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, carcinoma colorrectal, mieloma múltiple, leucemia que incluye leucemia aguda y carcinoma esofágico.

Fig. 1 –Análisis por SDS page de 1/3PD-PRAME con o sin marca de His en vector de pET21 (ejemplo/constructo N^{os}.: 3 y 4)

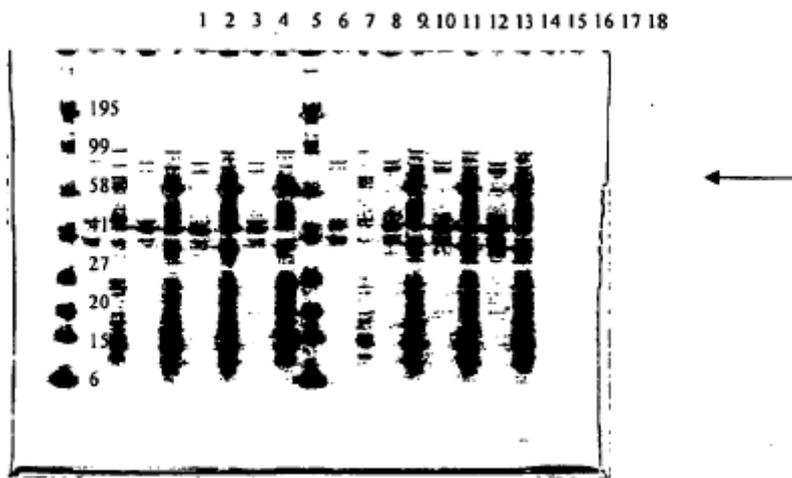


Fig 2 –Análisis por SDS page de 1/3PD-PRAME de codón optimizado con o sin marca de His en vector pET26 (ejemplos/constructos números 3a y 4a)

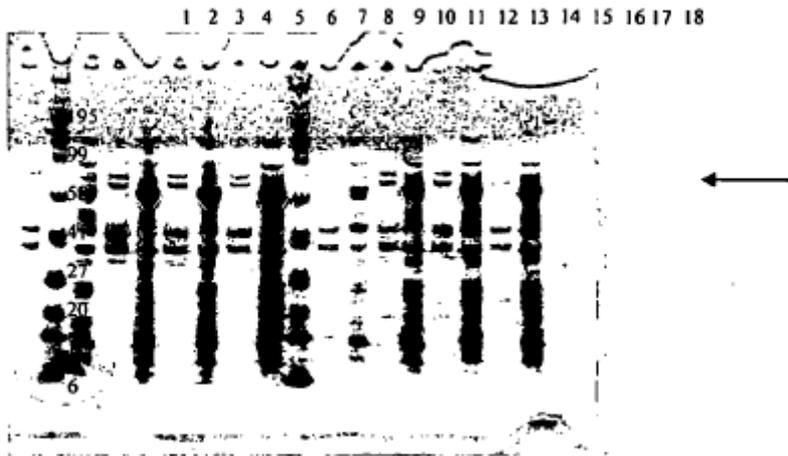


Figura 3

Respuesta de CD4 (coadyuvante AS01B)

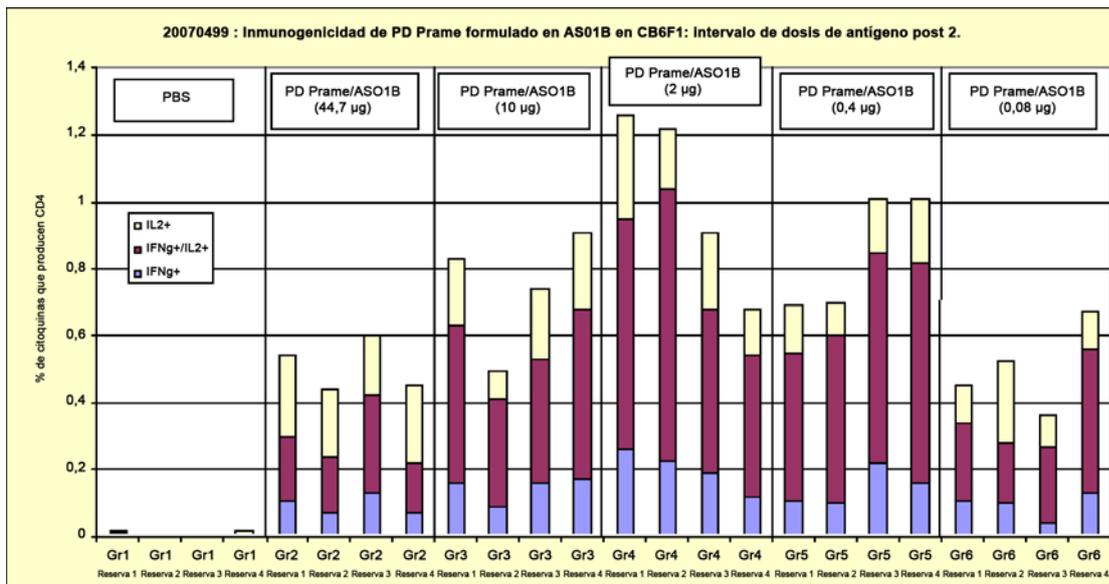


Figura 4

Respuesta de CD8 (coadyuvante AS01B - 20070499)

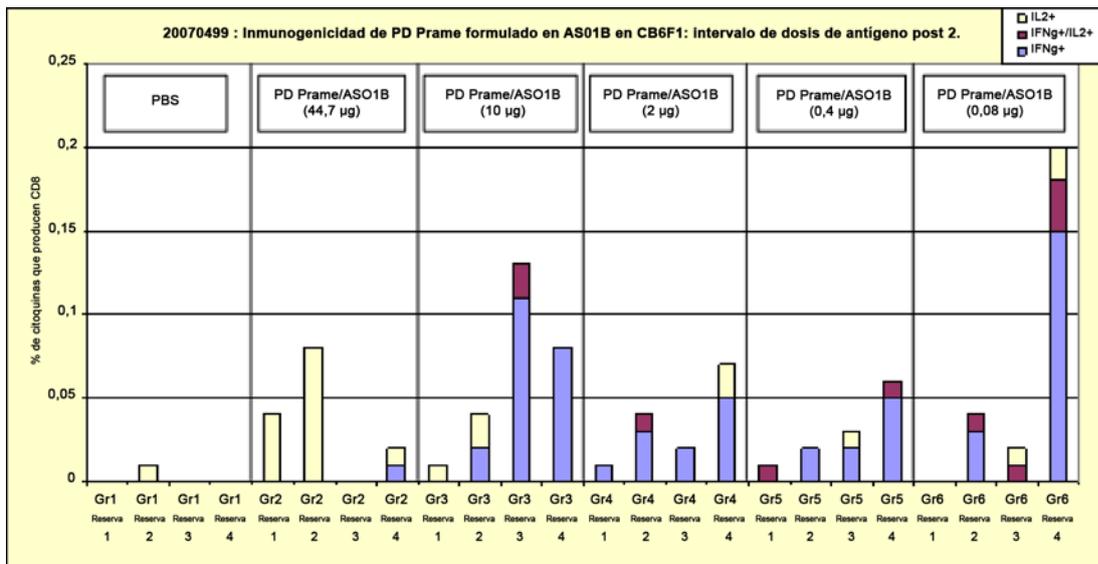


Figura 5

Respuesta de CD4 (coadyuvante AS15 - 20070502)

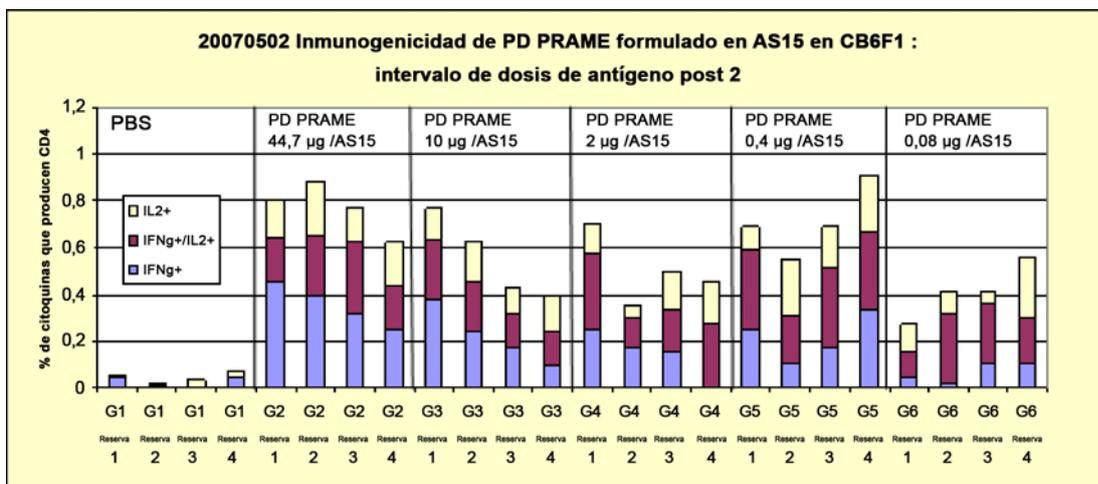


Figura 6

Respuesta de CD8 (coadyuvante AS15 - 20070502)

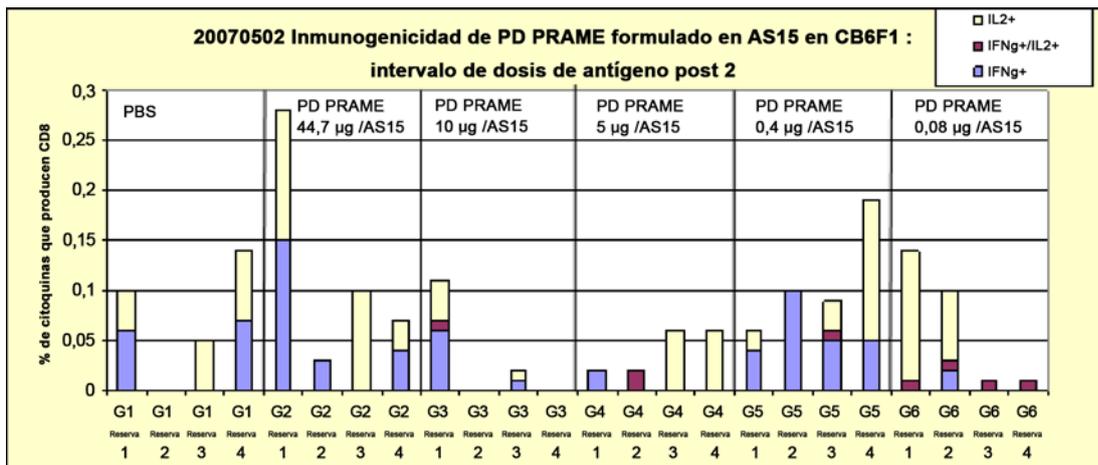


Figura 7

1 MDPSSHSSNM ANTQMKSDKI IAHRGASGY LPEHTLESKA LAFAQQADYL
 51 EQDLAMTKDG RLVVIHDHFL DGLTDVAKKF PHRHRKDGRY YVIDFTLKEI
 101 QSLEMTENFE TMERRRLWGS IQSRYISMSV WTSPRRLVEL AGQSLLKDEA
151 LAIAALELLP RELFPPLFMA AFDGRHSQTL KAMVQAWPFT CLPLGVLMKG
201 QHLHLETFA VLDGLDVLLA QEVPRRWKL QVLDLRKNSH QDFWTVWSGN
251 RASLYSFPEP EAAQPMTKKR KVDGLSTEAE QPFIPVEVLV DLFLKEGACD
301 ELFSYLIEKV KRKKNVLRIC CKKLKIFAMP MQDIKMILKM VQLDSIEDLE
351 VTCTWKLPTL AKFSPYLGQM INLRRLLSH IHASSYISPE KEEQYIAQFT
401 SQFLSLQCLQ ALYVDSLFFL RGRLDQLLRH VMNPLETISI TNCRLSEGDV
451 MHLSQSPSVS QLSVLSLSGV MLTDVSPEPL QALLERASAT LQDLVFDECG
501 ITDDQLLALL PSLSHCSQLT TLSFYGNSIS ISALQSLLQH LIGLSNLTHV
551 LYPVPLESYE DIHGTLHLER LAYLHARLRE LCELGRPSM VWLSANPCPH
601 CGDRTFYDPE PILCPCFMPN (TSG) / (LE) / HHHHHH

No se usó ninguna secuencia señal para esas construcciones

Negro = los primeros 109 aminoácidos de proteína D (AA 20-127 de proteína D)

Negro – marcado = aminoácidos insertados (Asp y Pro en aa 2 y 3)

Doble subrayado = proteína PRAME; aminoácidos 1-509 de PRAME (509 aa totales)

Negro - subrayado = marca de 6 His que varía dependiendo del clon

Figura 8

Alineación entre LipoD-MAGE3-His y pD1/3-PRAME-His

	1	60
LipoD-MAGE3-His	(1) MDPKTLALSLLAAGVLACGSSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF	
pD1/3-PRAME-His	(1) MDP-----SSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF	
	61	120
LipoD-MAGE3-His	(61) QQADYLBQDLAMTKDGRLLVVIHDFLDGLTDVAKKPPHRRHKDGRYYVIDFTLKEIQSLE	
pD1/3-PRAME-His	(45) QQADYLBQDLAMTKDGRLLVVIHDFLDGLTDVAKKPPHRRHKDGRYYVIDFTLKEIQSLE	
	121	180
LipoD-MAGE3-His	(121) MTENFETMDELE-----QRSQHCKPEEGLEARGEHLGLVGAQAPATEE---QE--	
pD1/3-PRAME-His	(105) MTENFETMRRRLWGSIQSRYISMSVWTSPRRLSELAGCSLLKDEALATAALELLPRELF	
	181	240
LipoD-MAGE3-His	(165) -----ASSSSSTLVEIT-----LG-----VPAAESPD	
pD1/3-PRAME-His	(165) PPLFMAAFDRHSQTLKAVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLETFKAVLDGLVLLAQEVR	
	241	300
LipoD-MAGE3-His	(188) P-----PQ-SPQGASGPPPTMNYPLSQSYEDSSSQEE-----EPSTFP	
pD1/3-PRAME-His	(225) PRRWKLQVLDLRKNSHQDFWQWGNRASLQSFPEPDAQPMTKKRKVDGLSTEQPFI	
	301	360
LipoD-MAGE3-His	(227) DESEFQAALSARKVAHLHFLLEKRYRREP-----	
pD1/3-PRAME-His	(285) PEVLVDLFLKEGACSEKFSYLSKVKRKKVLRRLCCKKLIKIFAMPQDIKMLKMWQLD	
	361	420
LipoD-MAGE3-His	(257) -----VT-X-----A-EMLSVYGNWQYFFPVIFSKSSS-----LQLVFGIELM	
pD1/3-PRAME-His	(345) SIEDLEVICTWKLPTLAKFSPYLGQNNLRRLLLSHILHSSYISPEKEEQYIAQFTSQFI	
	421	480
LipoD-MAGE3-His	(295) EVDPIGHLYTFFSTCLGLSYDGLIGDNOIMPKAGLLIIVLAIARIGDCAPEEKIWEELSV	
pD1/3-PRAME-His	(405) SQQCEQALVYDGLFFFLRGRLDQLLRHVNPLETLSITNCRSEGGVMHLSQSPSVSGLSV	
	481	540
LipoD-MAGE3-His	(355) LEFEGREDSLELGFPKKLLTQ-----HFVQVYLEYRQVPGSDPACYEFLM	
pD1/3-PRAME-His	(465) LSLSCVMLTDVSPHPLQALLERASATLQDLVFDECGITDQGLLALLPSLSHCSQLTTLSE	
	541	600
LipoD-MAGE3-His	(401) GPRVVEVTSYVKLHHVYKESGGPHLSYPP-----LHEWGLR	
pD1/3-PRAME-His	(525) YGNVSISSALQSLLQHGCSNLTHLYFVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELFCE	
	601	642
LipoD-MAGE3-His	(438) EGE-----E-----GHHHHHHH	
pD1/3-PRAME-His	(585) LGRPSMVWLSANPCPHCGDRFTFYDPEPILCPCFMPNHHHHHH	

Figura 9

Alineación entre la secuencia compartida de la proteína D original de *Haemophilus influenzae* y la LipoD-MAGE3-His

	1	50
Proteína D_H influenzae	(1) MKLKTLLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
LipoD-MAGE3-His	(1) MDPKTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
Consenso	(1) M KTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
	51	100
Proteína D_H influenzae	(51) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKPPHRH	
LipoD-MAGE3-His	(51) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKPPHRH	
Consenso	(51) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKPPHRH	
	101	127
Proteína D_H influenzae	(101) RKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
LipoD-MAGE3-His	(101) RKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
Consenso	(101) RKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	

Figura 10

Alineación entre la secuencia compartida de la proteína D original de *Haemophilus influenzae*, la LipoD-MAGE3-His y la pD1/3-PRAME-His

	1	50
Proteína D_H influenzae	(1) MKLKTLLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
LipoD-MAGE3-His	(1) MDPKTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
pD1/3-PRAME	(1) -----MSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
Consenso	(1) M KTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEH	
	51	100
Proteína D_H influenzae	(51) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRH	
LipoD-MAGE3-His	(51) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRH	
pD1/3-PRAME	(33) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRH	
Consenso	(51) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRH	
	101	127
Proteína D_H influenzae	(101) RKGGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
LipoD-MAGE3-His	(101) RKGGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
pD1/3-PRAME	(83) RKGGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	
Consenso	(101) RKGGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET	

Figura 11

Análisis por SDS page de pD1/3-PRAME con o sin señal de secreción (SS) y marca de His (His) en el vector pET21.

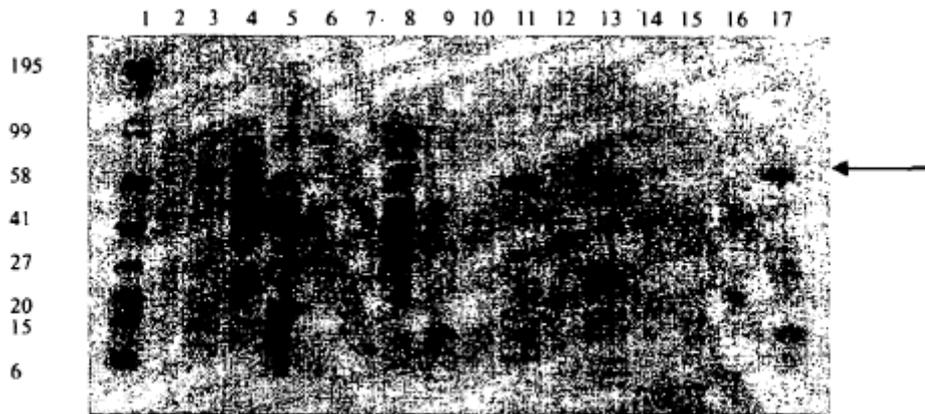


Figura 12

Secuencia de proteína D 1/3 MAGE-A3-His

Extremo Terminal MDP	N	Proteína D1/3	Met Asp	Mage 3	GlyGly 7xHis terminal	Extremo C
2		124	3	314		

```

MDPKTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAH 40
RGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLVV 80
IHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEIQSLE 120
MTENFETMDLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPAT 160
EEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAAESPDPPQSPQGASSLPT 200
TMNYPLWSQSYEDSSNQEEGPSTFPDLESEFQAALSRKV 240
AELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPVI FSK 280
ASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDN 320
QIMPKAGLLIIVLAI IAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFE 360
REDSILGDPKLLTQHVFQENYLEYRQVPGSDPACYEFLW 400
GPRALVETSYVKVLHMHVVKISGGPHISYPPLHEWVLEGE 440
EGGHHHHHHHHH 451
    
```

Subrayado = secuencia señal de proteína D que incluye Met-1 y las sustituciones Asp-2 y Pro-3

Subrayado doble = primeros 109 aminoácidos de proteína D de 20 a 129

MD = aminoácidos no relacionados Met-Asp en aa 128-129 para crear un sitio de clonación

GG = aminoácidos Gly-Gly no relacionados en 442-443

Subrayado con puntos = fragmento de MAGE3; aminoácidos 3-314 de MAGE3 (312 aa totales)

HHHHHHH = marca de 7 His