

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 079**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2006 E 06773349 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1896494**

54 Título: **Métodos y composiciones para desencadenar respuestas inmunitarias multivalentes contra epítomos dominantes y subdominantes expresados en células cancerosas y estroma tumoral**

30 Prioridad:

**17.06.2005 US 691579 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.07.2013**

73 Titular/es:

**MANKIND CORPORATION (100.0%)  
28903 NORTH AVENUE PAINE  
VALENCIA, CALIFORNIA 91355, US**

72 Inventor/es:

**QIU, ZHIYONG y  
BOT, ADRIAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 413 079 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

Métodos y composiciones para desencadenar respuestas inmunitarias multivalentes contra epítomos dominantes y subdominantes expresados en células cancerosas y estroma tumoral.

**Antecedentes de la invención**5 Campo de la invención

La divulgación está dirigida a la inducción de una respuesta inmunitaria limitada a MHC de clase I y al control de la naturaleza y magnitud de la respuesta, promoviendo así una intervención inmunológica eficaz en procesos patogénicos. La divulgación se refiere a composiciones inmunogénicas que pueden estimular una respuesta inmunitaria celular contra una célula diana. Se da a conocer en la presente memoria una composición inmunogénica que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica los epítomos de CTL PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub> o un análogo reactivo cruzado de cualquiera o ambos de los epítomos. La invención proporciona también métodos de uso de la composición inmunogénica descrita para desencadenar una respuesta inmunitaria equilibrada en un sujeto al que se administran dichas composiciones.

Descripción de la técnica relacionada

15 El cáncer se desarrolla generalmente cuando las células de una parte del cuerpo continúan creciendo y dividiéndose de manera desordenada al contrario que las células normales, que crecen, se dividen y mueren de forma ordenada. Aunque hay muchas clases de cáncer, habitualmente empiezan debido al crecimiento descontrolado de células anormales.

20 Las opciones de tratamiento habituales para el cáncer incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. Se está desarrollando una cuarta rama de tratamiento a la que se hace referencia como inmunoterapia. Las inmunoterapias intentan ayudar al sistema inmunitario a reconocer las células cancerosas y/o a fortalecer una respuesta contra células cancerosas para destruir el cáncer. Las inmunoterapias incluyen inmunoterapias activas y pasivas. Las inmunoterapias activas intentan estimular el propio sistema inmunitario del cuerpo para luchar contra la enfermedad. Las inmunoterapias pasivas generalmente no se basan en el cuerpo para atacar la enfermedad; en lugar de ello, usan componentes del sistema inmunitario (tales como anticuerpos) creados fuera del cuerpo del paciente.

A pesar de los diversos tipos de tratamientos de cáncer, existe una necesidad continua de opciones de tratamiento adicionales. La manipulación del sistema inmunitario mediante el uso de una vacuna anticancerosa es uno de dichos enfoques.

30 Para generar una vacuna u otra composición inmunogénica, se introduce en un sujeto un antígeno o epítomo contra el que puede crearse una respuesta inmunitaria. Aunque las células neoplásicas (cancerosas) derivan de, y por lo tanto son sustancialmente idénticas a, las células normales a nivel genético, muchas células neoplásicas son conocidas por presentar antígenos asociados a tumores (TuAA). En teoría, estos antígenos podrían usarse por el sistema inmunitario de un sujeto para reconocer y atacar las células neoplásicas como extrañas. Desgraciadamente, las células neoplásicas parecen ser generalmente ignoradas por el sistema inmunitario del hospedador.

35 El sistema inmunitario puede clasificarse en dos brazos efectores discretos. El primero es la inmunidad innata, que implica numerosos componentes celulares y factores solubles que responden a todas las ofensivas infecciosas. El otro es la respuesta inmunitaria adaptativa, que se ajusta para responder específicamente a epítomos precisos de agentes infecciosos. La respuesta inmunitaria adaptativa se divide además en dos brazos efectores conocidos como los sistemas inmunitarios humoral y celular. El brazo humoral está centrado en la producción de anticuerpos por linfocitos B, mientras que el brazo celular implica la actividad destructora de células de los linfocitos T citotóxicos.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) no reconocen epítomos en los agentes infecciosos mismos. En lugar de ello, los CTL detectan fragmentos de antígenos derivados de agentes infecciosos que se exhiben sobre la superficie de las células infectadas. Como resultado, los antígenos son visibles para los CTL solo después de haberse procesado por la célula infectada y por tanto exhibido sobre la superficie de la célula.

45 El sistema de procesamiento y exposición de antígeno sobre la superficie de las células está bien establecido. Los CTL reconocen antígenos peptídicos cortos, que se exhiben sobre la superficie en asociación no covalente con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Estos péptidos de clase I derivan a su vez de la degradación de proteínas citosólicas.

50 En la mayoría de casos, los procesos neoplásicos evolucionan para evitar los mecanismos de defensa inmunitaria empleando una serie de estrategias que dan como resultado la ignorancia, tolerancia o desviación inmunitaria. Se han descrito en la bibliografía métodos que terminan eficazmente con la tolerancia inmunitaria o que reparan la desviación inmunitaria contra antígenos expresados en células cancerosas (Okano F, *et al. J. Immunol.*, 1 de marzo de 2005; 174(5): 2645-52; Mocellin S, *et al., Exp. Cell. Res.* 1 de octubre de 2004; 299(2): 267-78; Banat G A, *et al., Cancer Immunol. Immunother.*, enero de 2001; 49(11): 573-86) y, a pesar de su asociación con niveles significativos de inmunidad sistémica, raramente dan como resultado la reducción de la carga tumoral. Los factores limitantes

significativos que inciden en este proceso son tráfico, activación local y/o actividad subóptimos de las células efectoras antitumorales. De hecho, se ha mostrado en muchos casos que la presencia intratumoral de células inmunitarias es un suceso raro, en comparación con la asociada a procesos inflamatorios tales como rechazo de órganos, infecciones o síndromes autoinmunitarios.

5 La respuesta inmunitaria resultante de la exposición a antígenos (en un contexto natural o después de vacunación) que engloban múltiples epítomos está asociada inherentemente a una jerarquía respecto a la magnitud de la respuesta inmunitaria frente a epítomos individuales diferentes. Esto sucede en el caso de los epítomos de linfocitos T tales como epítomos limitados a MHC de clase I y clase II, en que se ha documentando bien la dominancia y subdominancia. Los epítomos dominantes son aquellos que desencadenan proliferaciones destacadas y específicas de linfocitos T; mientras que los epítomos subdominantes desencadenan respuestas relativamente reducidas caracterizadas por una proliferación limitada de los linfocitos T específicos con funcionalidad disminuida.

10 Existen múltiples razones para que una respuesta inmunitaria se centre en un subconjunto de epítomos en un antígeno, independientemente de si el antígeno es natural o genomanipulado. Estas razones incluyen, pero sin limitación, las siguientes: eficacia de generación de ciertos precursores peptídicos o polipeptídicos en los proteosomas (para los limitados a la clase I) o los endosomas (para los limitados a la clase II); su transporte selectivo por TAP (para péptidos de clase I) y mecanismos alternativos hasta compartimentos en que sucede la carga en MHC; su afinidad por moléculas de MHC respecto a chaperones o la cadena polipeptídica invariable que ocupa el surco de unión a péptido de las moléculas de MHC nacientes y respecto a otros péptidos en competencia resultantes del procesamiento del mismo o un sustrato alternativo; la estabilidad del complejo de MHC-péptido resultante y la funcionalidad del repertorio de linfocitos T.

15 Además, dos o más epítomos de diferentes antígenos puestos juntos en la misma molécula artificial adoptan una relación dominante/subdominante debido a sus propiedades intrínsecas (tales como las descritas anteriormente). Esto limita la aplicabilidad práctica de moléculas compuestas con fines de inmunoterapia, particularmente cuando se persigue la orientación conjunta a células cancerosas (neoplásicas) y elementos estrómicos (tales como neovasculatura).

### Sumario de la invención

20 Para amplificar el control inmunomediado de los procesos tumorales, las realizaciones de la presente invención proporcionan un ataque inmunomediado a la neovasculatura, además de un ataque directo a las células tumorales, como componente de una estrategia de vacuna divalente o multivalente dirigida a establecer un entorno inflamatorio en el tumor que dé como resultado la reducción, estabilización o disminución de la velocidad de crecimiento e invasión (local o sistémica). Esta metodología puede ser más eficaz para controlar procesos tumorales que estrategias que se orientan a células cancerosas o a la neovasculatura solo y tiene implicaciones beneficiosas con respecto al índice terapéutico (eficacia/seguridad).

25 Algunas realizaciones se refieren a métodos y composiciones que modulan las respuestas inmunitarias contra epítomos con diferentes propiedades inmunitarias intrínsecas (por ejemplo, estado dominante frente a subdominante en un contexto de inmunización dado), de manera coherente con el aumento de la actividad relativa de los epítomos subdominantes para conseguir la inducción conjunta de respuestas inmunitarias equilibradas contra múltiples epítomos. Esta invención es útil cuando se orienta conjuntamente a múltiples antígenos tales como aquellos expresados por células cancerosas y/o el estroma subyacente.

30 En algunas realizaciones, la orientación conjunta a neovasculatura tumoral y células cancerosas, o a múltiples antígenos en células cancerosas, puede conseguirse mediante composiciones inmunoterapéuticas que comprenden vectores de expresión tales como plásmidos que desencadenan inmunidad contra células transformadas, células tumorales y células endoteliales de la neovasculatura. El diseño de plásmidos en formato de "collar de perlas" se logra como se da a conocer en la solicitud de publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0228634, titulada "Vectores de expresión que codifican epítomos de antígenos asociados a diana y métodos para su diseño". Es una realización preferida un plásmido divalente que comprende elementos inmunogénicos derivados de una molécula o moléculas expresadas en células cancerosas y una molécula o moléculas expresadas en la neovasculatura. En realizaciones particulares de la invención, dichas moléculas corresponden a los epítomos PRAME y PSMA y análogos reactivos cruzados de los mismos.

35 En otra realización, vectores tales como plásmidos expresan elementos inmunogénicos derivados de moléculas expresadas conjuntamente por células cancerosas y neovasculatura. En aún otra realización, vectores tales como plásmidos expresan elementos inmunogénicos derivados de un receptor y su ligando, estando expresado el receptor o el ligando por la neovasculatura, y expresando células cancerosas el otro.

40 En todavía otra realización, los vectores codifican componentes inmunogénicos de moléculas expresadas por células cancerosas o neovasculatura (u otras células estrómicas) junto con modificadores de la respuesta biológica, incluyendo modificadores que actúan a través de receptores antigénicos en linfocitos B y T y aquellos que no lo hacen.

- En algunas realizaciones, los vectores pueden administrarse en una secuencia cronológica con otros agentes inmunogénicos, tales como péptidos, con fines de amplificar o modular la actividad terapéutica contra células cancerosas, neovascularización o ambos (dado a conocer en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20050079152, titulada "Métodos para controlar la respuesta inmunitaria limitada a MHC de clase I"; la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/640.402, presentada el 29 de diciembre de 2004 y la publicación de EE.UU. nº 2006/0165711, todas tituladas "Métodos para desencadenar, potenciar y mantener una respuesta inmunitaria contra epítomos limitados a MHC de clase I con fines profilácticos o terapéuticos" y la publicación de patente de EE.UU. 2007/0003563, titulada "Inmunoterapias multivalentes para carcinoma", presentada en la misma fecha que esta solicitud y que equilibra la respuesta contra epítomos subdominantes y dominantes.
- 5 Inducir respuestas inmunitarias ante epítomos que son "subdominantes" en el contexto de un antígeno nativo proporciona beneficios para tratar el cáncer, puesto que dichos epítomos pueden estar implicados en la selección negativa (central o periférica) que sucede en individuos enfermos. Por tanto, los constructos que engloban múltiples copias de un epítomo subdominante pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria aumentada contra dicho epítomo manteniendo la inmunidad contra los dominantes.
- 10 Además, la inducción conjunta eficaz de respuestas inmunitarias contra epítomos de diferentes antígenos presentados por la misma molécula puede ofrecer un enfoque más práctico para generar inmunidad contra múltiples antígenos. Esto tiene implicaciones directas para el tratamiento y la prevención de enfermedades tumorales e infecciosas.
- 15 Globalmente, las respuestas inmunitarias más amplias conseguidas por dichos métodos y composiciones son más eficaces para tratar los procesos patogénicos en contraposición con las respuestas inmunitarias fuertemente dominadas por un número limitado de especificidades. Además, la práctica de vectores multivalentes en dichos métodos y composiciones puede aliviar la necesidad de usar numerosos componentes y protocolos de administración engorrosos para conseguir respuestas multivalentes equilibradas.
- 20 Algunas realizaciones se refieren a plásmidos divalentes que expresan secuencias epitópicas de PRAME y PSMA (tales como las dadas a conocer en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. nº 20030220239, 20050221440, 20050142144 y la publicación de patente PCT nº WO 02/081646, titulada "Secuencias epitópicas" y a usos de estas composiciones, individualmente o en combinación con otros plásmidos, para desencadenar una respuesta inmunitaria equilibrada. Dichos usos pueden incluir una etapa de iniciación o encaminamiento en la que la composición puede suministrarse a diversas localizaciones en el animal, pero preferiblemente se suministra al sistema linfático, por ejemplo un nódulo linfático. La etapa de encaminamiento puede incluir uno o más suministros de esa composición, por ejemplo, distribuidos por un periodo de tiempo o de forma continua durante un periodo de tiempo.
- 25 Los usos pueden incluir además una etapa de amplificación, que comprende administrar una composición que comprende un inmunógeno peptídico que tiene similitud sustancial o similitud funcional con los correspondientes epítomos codificados por la composición de ácido nucleico. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser una secuencia reactiva cruzada del correspondiente epítomo. La etapa de amplificación puede efectuarse una o más veces, por ejemplo a intervalos durante un periodo de tiempo, en una embolada o de forma continua durante un periodo de tiempo. Aunque no se requiere en todas las realizaciones, algunas realizaciones pueden incluir el uso de composiciones que incluyen un inmunopotenciador o coadyuvante.
- 30 Se ha observado que, usando este tipo de protocolo de inmunización, el plásmido no solo puede iniciar una respuesta inmunitaria, sino que sesga la respuesta y su amplificación posterior hacia un carácter efector en contraposición con uno regulador. Sin esta inmunización basada en ácido nucleico anterior, la administración repetida de péptido conduce a una respuesta aún más dominada por los linfocitos T reguladores. El sesgo permanente hacia una respuesta efectora se denomina encaminamiento.
- 35 Las realizaciones adicionales incluyen aquellas en que se usan los plásmidos divulgados individualmente o en cualquier combinación. Las composiciones peptídicas correspondientes a estos epítomos y usadas en la parte de amplificación de la estrategia de inmunización pueden ser secuencias nativas o análogos peptídicos sustancialmente similares o funcionalmente similares a la secuencia epitópica nativa. Los péptidos pueden incorporarse al protocolo de amplificación individualmente o en combinaciones de 2, 3 o 4 de los inmunógenos. Las razones para usar menos de todos los epítomos peptídicos incluyen, pero sin limitación, las siguientes: 1) expresión subóptima de cualquiera de los antígenos, 2) el paciente no expresa, o ya no expresa, el correspondiente antígeno, 3) se está generando una respuesta menos robusta ante uno u otro de los epítomos, en cuyo caso pueden administrarse dicho péptido o péptidos en ausencia de los demás para obtener una respuesta más equilibrada y 4) puede retirarse un péptido si genera algún tipo de inmunotoxicidad.
- 40 Realizaciones adicionales se refieren a métodos de modulación de la respuesta inmunitaria cambiando el número relativo de epítomos inmunogénicos en una composición de ácido nucleico. Estas realizaciones pueden englobar también cambiar la inmunogenicidad intrínseca del inmunógeno, por ejemplo, codificando sustituciones aminoacídicas en el epítomo inmunogénico.
- 45
- 50
- 55

Las realizaciones pueden englobar adicionalmente métodos de modulación de la respuesta inmunitaria mediante regulación positiva por refuerzo peptídico. Las composiciones peptídicas correspondientes a esta etapa de amplificación pueden ser secuencias nativas o análogos peptídicos sustancialmente similares o funcionalmente similares a la secuencia epitópica nativa. La regulación positiva selectiva puede conseguirse mediante la administración del péptido correspondiente al epítipo subdominante para obtener una respuesta inmunitaria equilibrada.

Todavía otras realizaciones incluyen plásmidos que codifican un análogo de cualquiera de los epítipos PSMA o PRAME. Realizaciones adicionales pueden incluir diferentes epítipos (tales como los dados a conocer en las publicaciones de patente de EE.UU. n° 20030220239 y 20040180354, ambas tituladas "Secuencias epitópicas") y análogos sustituidos en combinación similar a los epítipos expresados en los plásmidos RP8 y RP12 y los correspondientes inmunógenos peptídicos administrados como la parte de amplificación de la estrategia de inmunización.

Algunas realizaciones se refieren a constructos de ácido nucleico que codifican un polipéptido que incluye una o más copias del epítipo de CTL PSMA<sub>288-297</sub> (SEQ ID NO:6) y una o más copias del epítipo de CTL PRAME<sub>425-433</sub> (SEQ ID NO:5), o un análogo reactivo cruzado que comprende 1-3 sustituciones de uno o ambos de los epítipos, en el que el polipéptido no incluye un antígeno entero. Uno o ambos epítipos pueden estar codificados en una secuencia de liberación, por ejemplo. El polipéptido puede incluir además una secuencia de codificación de uno o más complejos epitópicos. El constructo de ácido nucleico puede incluir un complejo epitópico PRAME, por ejemplo, los aminoácidos 422-509 de PRAME (SEQ ID NO:21). El constructo de ácido nucleico puede incluir un complejo epitópico PSMA, por ejemplo, uno o más complejos epitópicos pueden ser los aminoácidos 3-45 o 217-297 de PSMA. El análogo epitópico de PSMA puede contener una sustitución 1297V, por ejemplo. El constructo de ácido nucleico puede incluir además uno o más de una secuencia de importación nuclear, un promotor (por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV)), una secuencia de poliA o uno o más motivos inmunoestimulantes CpG. La secuencia de liberación de ambos epítipos PRAME y PSMA puede localizarse, por ejemplo, en la parte N-terminal del polipéptido codificado. El polipéptido codificado puede ser, por ejemplo, la SEQ ID NO:2. La secuencia de liberación de ambos epítipos PRAME y PSMA puede estar localizada, por ejemplo, en la parte C-terminal del polipéptido codificado. Por ejemplo, el polipéptido codificado puede ser la SEQ ID NO:4.

Algunas realizaciones se refieren a composiciones inmunogénicas que incluyen un constructo de ácido nucleico descrito anteriormente y en otro lugar de la presente memoria.

Algunas realizaciones se refieren a usos en los que se trata un cáncer individual mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo de ácido nucleico descrito anteriormente y en otro lugar de la presente memoria. El constructo de ácido nucleico puede administrarse por vía intranodal, por ejemplo. El individuo puede tener un cáncer que exprese PRAME, PSMA o ambos en células neoplásicas o células de neovasculatura asociada a tumores.

Algunas realizaciones se refieren a usos en los que se trata un cáncer individual mediante la administración de una cantidad eficaz del constructo de ácido nucleico descrito anteriormente y en otro lugar de la presente memoria para inducir una respuesta inmunitaria; y la amplificación de la respuesta inmunitaria mediante refuerzo con al menos un análogo peptídico correspondiente a un epítipo codificado por el constructo de ácido nucleico. El individuo puede tener, por ejemplo, un cáncer que exprese PRAME en células cancerosas y PSMA en células de vasculatura asociada a tumores. El individuo puede tener un cáncer que exprese PRAME, PSMA o ambos en células neoplásicas o células de neovasculatura asociada a tumores.

Algunas realizaciones se refieren al uso de una composición inmunogénica o constructo de ácido nucleico como se describe anteriormente y en otro lugar de la presente memoria en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un individuo que tiene cáncer. El medicamento puede ser para el tratamiento de un individuo que tiene cáncer mediante la administración del medicamento por vía intranodal. El individuo puede tener un cáncer que exprese PRAME, PSMA o ambos en células neoplásicas o células de neovasculatura asociada a tumores.

Algunas realizaciones se refieren al uso de una composición inmunogénica o un constructo de ácido nucleico como se describe anteriormente y en otro lugar de la presente memoria en la preparación de un medicamento para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria orientada a neovasculatura asociada a tumores. Por ejemplo, las células de vasculatura asociada a tumores exhiben PRAME.

### Breve descripción de los dibujos

**FIG. 1.** Estructura de dos plásmidos monovalentes y un plásmido divalente.

**FIG. 2.** Ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr que expone el % de lisis celular específica en células que expresan los plásmidos P2, R2 y RP5. Los datos se presentan como sigue: el eje x muestra las células diana usadas con diferentes relaciones de efector a diana; el eje y muestra el correspondiente porcentaje de lisis específica.

**FIG. 3.** Estructura de plásmidos adicionales diseñados que expresan tanto epítipos PRAME como PSMA. Se expone la estructura del plásmido PRAME monovalente R2. P2 representa el plásmido PSMA monovalente.

**FIG. 4.** Análisis ELISpot de PRAME y PSMA que expone la inducción de respuestas divalentes conseguidas por plásmidos que engloban epítomos de los diferentes antígenos expuestos en la FIG. 3. Se inmunizaron los animales con 2 inyecciones de plásmido divalente PRAME/PSMA (1 mg/ml) en nódulos linfáticos bilaterales. Se incubaron  $5 \times 10^5$  esplenocitos aislados con 10 µg de péptido natural de PSMA<sub>288-297</sub> (SEQ ID NO:6) o 10 µg de péptido natural de PRAME<sub>425-433</sub> (SEQ ID NO:5) durante 42 horas antes del desarrollo. Las gráficas representan media ± EE.

**FIG. 5.** Análisis tetramérico de PRAME y PSMA después de inmunización con plásmido divalente RP12. Los datos muestran una respuesta inmunitaria divalente ante PRAME y PSMA con dominancia relativa de la respuesta contra el epítomo PRAME en ratones sensibilizados solo con plásmido.

**FIG. 6A-6B.** Análisis tetramérico de PRAME y PSMA en ratones que reciben inmunización con plásmido divalente RP12 o RP8 seguido de refuerzo con análogo peptídico de PSMA<sub>288-297</sub> (I297V) (SEQ ID NO:7) (**FIG. 6A**). Análisis tetramérico de PRAME y PSMA en animales individuales después de inmunización con plásmido divalente RP12 o RP8 y refuerzo con análogo peptídico de PSMA<sub>288-297</sub> (I297V) (SEQ ID NO:7) (**FIG. 6B**).

**FIG. 7.** Análisis ELISpot en animales sensibilizados con RP12 o RP8 y reforzados con análogos peptídicos de PSMA<sub>288-297</sub> (I297V) (SEQ ID NO:7) y PRAME<sub>425-433</sub> (L426Nva, L433Nie) (SEQ ID NO:30).

**FIG. 8.** Secuencia polipeptídica de RP8 (SEQ ID NO:2).

**FIG. 9.** Secuencia polipeptídica de RP12 (SEQ ID NO:4).

#### Descripción detallada de la realización preferida

Las realizaciones se refieren a composiciones que pueden desencadenar respuestas inmunitarias multivalentes contra epítomos dominantes y subdominantes. Algunas realizaciones se refieren también a métodos de diseño de la composición: seleccionando antígenos que se expresan por células cancerosas y/o células estrómicas (neovasculatura); definiendo epítomos que pueden tener propiedades inmunitarias intrínsecas diferentes, que constituyen dianas inmunitarias válidas en dichas células cancerosas o estrómicas y modulando el número relativo de epítomos dominantes y subdominantes en una cierta molécula (tal como un vector terapéutico), reduciendo la relación entre el número de epítomos dominantes y subdominantes y proporcionando residuos flanqueantes óptimos para generación apropiada en los compartimentos de procesamiento.

Se describen métodos adicionales tales como reemplazar una o múltiples copias de epítomos subdominantes por secuencias análogas o preferiblemente situar epítomos en la molécula para modificar la inmunogenicidad relativa de dichos epítomos y asegurar una respuesta multivalente más equilibrada. El ensayo de la eficacia puede seguir al diseño de un conjunto de epítomos candidatos. El uso de dichas moléculas puede complementarse mediante la amplificación selectiva de respuestas contra epítomos subdominantes, en el contexto de estrategias de inmunización por sensibilización y refuerzo.

El método general para el diseño de vacuna puede implicar utilizar un algoritmo definido que empieza por una secuencia natural o artificial para encontrar la relación correcta de epítomos dominantes y subdominantes para plásmidos, vectores y moléculas que engloban múltiples copias de epítomos dominantes y subdominantes; genomanipular un conjunto de compuestos; etapas de caracterización *in vitro* e *in vivo* y selección de los plásmidos u otros vectores apropiados que desencadenan la respuesta inmunitaria equilibrada deseada.

Un epítomo, como se hace referencia en la presente memoria, es una molécula o sustancia capaz de estimular una respuesta inmunitaria. En realizaciones preferidas, los epítomos según esta definición incluyen, pero no están necesariamente limitados, a un polipéptido y un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en el que el polipéptido es capaz de estimular una respuesta inmunitaria. En otras realizaciones preferidas, los epítomos según esta definición incluyen, pero no están necesariamente limitados a, péptidos presentados sobre la superficie de células, estando los péptidos ligados no covalentemente con el surco de unión de MHC de clase I, de tal modo que puedan interactuar con receptores de linfocitos T.

Un epítomo de MHC, como se hace referencia en la presente memoria, es un polipéptido que tiene una afinidad de unión conocida o predicha por una molécula de complejo de histocompatibilidad principal (MHC) de mamífero de clase I o clase II.

Un epítomo inmunitario, como se hace referencia en la presente memoria, es un fragmento polipeptídico que es un epítomo de MHC, y que se exhibe sobre una célula en que los proteosomas inmunitarios están predominantemente activos. En otra realización preferida, un epítomo inmunitario se define como un polipéptido que contiene un epítomo inmunitario según la definición anterior, que está flanqueado por uno o varios aminoácidos adicionales. En otra realización preferida, un epítomo inmunitario se define como un polipéptido que incluye una secuencia de complejo epitópico que tiene al menos dos secuencias polipeptídicas que tienen una afinidad conocida o predicha por un MHC de clase I. En aún otra realización preferida, un epítomo inmunitario se define como un ácido nucleico que codifica un epítomo inmunitario según cualquiera de las definiciones anteriores.

- Similitud sustancial- Este término se usa para hacer referencia a secuencias que difieren de una secuencia de referencia de manera intrascendente a juzgar por el examen de la secuencia. Las secuencias de ácido nucleico que codifican la misma secuencia aminoacídica son sustancialmente similares a pesar de las diferencias en posiciones degeneradas o diferencias moderadas de longitud o composición de cualquier región no codificante. Las secuencias aminoacídicas que difieren solo por sustituciones conservativas o variaciones de longitud menores son sustancialmente similares. Adicionalmente, las secuencias aminoacídicas que comprenden epítomos constitutivos que difieren en el número de residuos flanqueantes N-terminales, o epítomos inmunitarios y complejos epitópicos que difieren en el número de residuos flanqueantes en cualquier extremo, son sustancialmente similares. Los ácidos nucleicos que codifican secuencias aminoacídicas sustancialmente similares son a su vez sustancialmente similares.
- Similitud funcional- Este término se usa para hacer referencia a secuencias que difieren de una secuencia de referencia de manera intrascendente a juzgar por el examen de una propiedad biológica o bioquímica, aunque las secuencias pueden no ser sustancialmente similares. Por ejemplo, dos ácidos nucleicos pueden ser útiles como sondas de hibridación para la misma secuencia pero codificar secuencias aminoacídicas diferentes. Dos péptidos que inducen respuestas de CTL reactivas cruzadas son funcionalmente similares incluso si difieren en sustituciones aminoacídicas no conservativas (y por tanto no satisfacen la definición de similitud sustancial). Los pares de anticuerpos, o TCR, que reconocen el mismo epítomo pueden ser funcionalmente similares entre sí a pesar de cualquier diferencia estructural que exista. En el ensayo de similitud funcional de la inmunogenicidad, se inmunizaría generalmente con el antígeno "alterado" y se ensayaría la capacidad de la respuesta desencadenada (Ab, CTL, producción de citocina, etc.) para reconocer el antígeno diana. Por consiguiente, pueden diseñarse dos secuencias que difieran en ciertos aspectos manteniendo la misma función. Dichas variantes de secuencias diseñadas están entre las realizaciones de la presente invención.

### I. Construcción de plásmido

Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan una serie de plásmidos, por ejemplo, pRP8 (SEQ ID NO:1), pRP9, pRP10, pRP11, pRP12 (SEQ ID NO:3) y pRP13, que tienen la capacidad de desencadenar o promover una respuesta divalente contra los antígenos asociados a tumores PRAME y PSMA, específicamente contra los epítomos PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub>. En realizaciones particulares de la invención, se proporciona el plásmido pRP12 como composición inmunogénica. La metodología de generación de constructos de plásmido de la invención se detalla a continuación.

La construcción de plásmidos en realizaciones preferidas puede suponer el ligamiento por etapas de oligonucleótidos complementarios largos, dando como resultado la generación de una secuencia de ADN que codifica epítomos dispuestos como un "collar de perlas". Estos ADN portan extremos cohesivos apropiados para enzimas de restricción que pueden usarse para ligamiento adicional con ADN que codifican regiones de complejo epitópico, que se amplifican efectuando PCR en el ADNc clonado de PSMA o PRAME como molde. Se liga entonces todo el inserto en el esqueleto del vector entre los sitios de restricción *Afl* II y *Eco*R I. Se verifica toda la secuencia de codificación por secuenciación de ADN. Puede usarse la mutagénesis basada en PCR para generar una secuencia que codifica un péptido epitópico análogo, o para ajustar el número de copias de epítomos dominantes/subdominantes para conseguir la relación deseada. Las secuencias de los dos plásmidos, RP8 y RP12, se describen con detalle y se dan a conocer como SEQ ID NO.1 y SEQ ID NO.3. Para los plásmidos específicos descritos en la presente memoria, el esqueleto del vector es una versión modificada de pVAX de Invitrogen (Carlsbad, CA), que se ha dado a conocer anteriormente en la patente de EE.UU. nº 6.709.844, titulada "Evitación de intermedios de replicación indeseables en la propagación de plásmidos" y la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/561.572, titulada "Vectores de expresión que codifican epítomos de antígenos asociados a diana". Un experto en la materia reconocerá que las secuencias de codificación de la presente invención pueden colocarse en cualquier vector de ácido nucleico adecuado para uso como vacuna sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, las secuencias que codifican los demás plásmidos mencionados pueden insertarse en el mismo esqueleto o similar al usado en los plásmidos pRP8 y pRP12.

pRP8 y pRP12 son plásmidos de ADN recombinante que codifican un polipéptido con epítomos de CTL limitados a HLA A2 de PSMA (288-297 y un análogo del mismo) y PRAME (425-433). Ambos polipéptidos incluyen también regiones que comprenden complejos epitópicos de PSMA (3-45, 217-297) y PRAME (422-509). Flanqueando los epítomos de PSMA y PRAME definidos están secuencias aminoacídicas cortas óptimas para la liberación de los epítomos en cuestión mediante procesamiento con inmunoproteasa. La secuencia de codificación del polipéptido en el plásmido está bajo el control de la secuencia promotora/potenciadora de citomegalovirus (CMVp), que permite una transcripción eficaz del ARNm del polipéptido tras la captación por APC. La señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina (poliA de BGH) en el extremo 3' de la secuencia de codificación proporciona una señal de poliadenilación del mensajero para aumentar su estabilidad así como la translocación fuera del núcleo al citoplasma para traducción. Para facilitar el transporte de plásmido al núcleo después de la captación, se ha insertado una secuencia de importación nuclear (NIS) de virus 40 de simio (SV40) en el esqueleto del plásmido. El plásmido porta dos copias de un motivo inmunoestimulante CpG, uno en la secuencia NIS y otro en el esqueleto del plásmido. Por último, dos elementos genéticos procarióticos en el plásmido son los responsables de la amplificación en *E. coli*, el gen de resistencia a kanamicina (kan R) y el origen de replicación bacteriano pMB1.

#### A. Plásmido de ADN recombinante RP8

Para RP8, la secuencia aminoacídica del polipéptido codificado (297 residuos aminoacídicos de longitud; SEQ ID NO:2) contiene dos secuencias de liberación, un sustrato de 17 aminoácidos en su extremo N para PRAME<sub>425-433</sub> (**MKRPSIKR-SLLQHLIGL**) y un sustrato de 66 aminoácidos en su extremo C para PSMA<sub>288-297</sub> (RK-**GLPSIPVHPI-LV-GLPSIPVHPI**-KRISPEKEEQYIAKR-**GLPSIPVHPI**-KRPSIKR-**RGLPSIPVHPV**; SEQ ID NO:8). Se muestra toda la secuencia polipeptídica del inmunógeno codificado (SEQ ID NO:2) en la FIG. 8.

El tramo de los primeros 8 residuos aminoacídicos es una secuencia artificial que se ha mostrado que facilita el procesamiento de epítomos de CTL por inmunoproteosomas. Los siguientes 9 aminoácidos (en *cursiva*) son PRAME<sub>425-433</sub> (SEQ ID NO:5), un potente epítomo de CTL específico de HLA A2 que provoca fuertes respuestas inmunitarias antitumorales tanto en la inmunización *in vitro* de PBMC humanos como en la inmunización *in vivo* de ratones. Esta secuencia epitópica de PRAME es seguida por un segmento (aminoácidos 18-105 del inmunógeno) de PRAME<sub>422-509</sub> que comprende dos complejos epitópicos: PRAME<sub>422-443</sub> y PRAME<sub>459-487</sub>. Se colocan dos complejos epitópicos de PSMA (en *cursiva*), PSMA<sub>3-45</sub> (SEQ ID NO:22) (aminoácidos 108-150) y PSMA<sub>217-297</sub> (SEQ ID NO:24) (aminoácidos 151-231), después del complejo epitópico de PRAME. Estos y otros complejos epitópicos de PRAME y PSMA se han dado a conocer en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° US 2003/0220239, US 2005/0142144 y US 2005/0221440, cada una titulada "Secuencias epitópicas". Estos complejos epitópicos contienen una serie de epítomos específicos de HLA A2 predichos y por tanto pueden ser útiles para generar una respuesta ante epítomos inmunitarios (descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20030215425, titulada "Sincronización de epítomos en células presentadoras de antígeno" y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 20030228634, 20040132088 y 20040203051, tituladas "Complejos epitópicos). Una matriz epitópica en "collar de perlas" con múltiples copias de PSMA<sub>288-297</sub> (GLPSIPVHPI (SEQ ID NO:6), en **negrita**) constituye el resto del polipéptido (aminoácidos 232-297). Se incorporan cuatro copias de PSMA<sub>288-297</sub>, siendo la última copia un análogo (GLPSIPVHPV; SEQ ID NO:7). Se ha mostrado que tanto el PSMA<sub>288-297</sub> nativo como su análogo inducen respuestas de CTL significativas tanto en inmunización *in vitro* de PBMC humanos como en inmunización *in vivo* de ratones, exhibiendo el análogo una elevada unión a MHC de clase I e inmunogenicidad. Entre las secuencias epitópicas de PSMA<sub>288-297</sub> hay secuencias aminoacídicas cortas diseñadas para ser "secuencias auxiliares de escisión" para facilitar el procesamiento y liberación del epítomo. Estos dos epítomos se codifican por tanto de tal manera que puedan expresarse, procesarse y presentarse por pAPC.

#### B. Plásmido de ADN recombinante RP12

Para el plásmido RP12, la secuencia aminoacídica del polipéptido codificado (275 residuos aminoacídicos de longitud; SEQ ID NO:4) contiene un sustrato aminoacídico o secuencia de liberación y un "collar de perlas" híbrido que engloba un sustrato en su extremo C para la liberación de ambos epítomos de PRAME y PSMA. Se muestra la secuencia polipeptídica completa del inmunógeno codificado en la FIG. 9. La secuencia de liberación representada como SEQ ID NO:9 es como sigue: KR-**SLLQHLIGL**-GDAAY-**SLLQHLIGL**-ISPEKEEQYIA-**SLLQHLIGL**-KRPSIKR-**GLPSIPVHPV**.

Los segmentos de los aminoácidos 2-44, 45-126 y 127-213 del inmunógeno codificado son complejos epitópicos unidos sucesivamente: PSMA<sub>3-45</sub>, PSMA<sub>217-297</sub> y PRAME<sub>422-509</sub>, respectivamente. En el sustrato híbrido de "collar de perlas", hay tres copias de PRAME<sub>425-433</sub> (**SLLQHLIGL**, en **negrita**; SEQ ID NO:5) y una copia de análogo de PSMA<sub>288-297</sub> (GLPSIPVHPV; en **negrita** Sans serif; SEQ ID NO:7) en el extremo C del polipéptido. Entre las secuencias epitópicas PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub> hay secuencias aminoacídicas diseñadas para ser "secuencias auxiliares de escisión" para facilitar el procesamiento y liberación de los epítomos. Estos dos epítomos se codifican por tanto de tal manera que puedan expresarse, procesarse y presentarse por pAPC.

Todos los demás plásmidos se construyeron de forma similar usando la metodología aplicada a RP8 y RP12. El plásmido R2, al que también se hace referencia como pCTLR2, se da a conocer en los ejemplos. El plásmido P2 como se muestra en las FIG. 1 y 3, es un plásmido de PSMA monovalente. El plásmido RP5 engloba elementos tanto de P2 como de R2.

Están bien establecidas en la materia diversas metodologías para construir o diseñar plásmidos, como conocerá el experto en la materia. Dichas metodologías se describen en muchas referencias tales como, por ejemplo, "Molecular Cloning", Sambrook J y Russell D. W., CSHL Press, (2001).

En la construcción de los ácidos nucleicos que codifican los epítomos polipeptídicos de la invención, puede usarse la secuencia génica de un antígeno asociado a tumores (por ejemplo, PRAME y PSMA), o puede ensamblarse el polinucleótido a partir de cualquiera de los correspondientes codones. Para un epítomo de 10 aminoácidos, esto puede constituir del orden de  $10^6$  secuencias diferentes, dependiendo de la composición aminoacídica particular. Aunque grande, este es un conjunto diferenciado y fácilmente definible que representa una fracción minúscula de los  $>10^{18}$  posibles polinucleótidos de esta longitud, y por tanto en algunas realizaciones los equivalentes de una secuencia particular dados a conocer en la presente memoria engloban dichas variaciones diferenciadas y fácilmente definibles de la secuencia enumerada. Al elegir una en particular de estas secuencias para uso en una vacuna, pueden usarse consideraciones tales como uso de codón, autocomplementariedad, sitios de restricción, estabilidad química, etc., como resultará evidente para un experto en la materia.

Un complejo epitópico como se contempla en la presente invención es un polipéptido, o una secuencia de ácido nucleico que lo codifica, que es un segmento de una secuencia proteica nativa que comprende dos o más epítomos conocidos o predichos con actividad de unión a un elemento de restricción de MHC compartido, en el que la densidad de epítomos en el complejo es mayor que la densidad de todos los epítomos conocidos o predichos con afinidad de unión por el elemento de restricción de MHC compartido en la secuencia proteica completa. Se describen complejos epitópicos y sus usos en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 20030220239, 20050221440, 20050142144, 20030215425, 20030228634, 20040132088, 20040203051 y la publicación de solicitud de patente PCT WO 02/081646.

Un sustrato o secuencia de liberación, como se emplea en la presente invención, es una secuencia diseñada o genomanipulada que comprende o codifica un epítomo de PRAME y/o PSMA embebido en una secuencia mayor que proporciona un contexto que permite que el epítomo de PRAME y/o PSMA se libere por procesamiento inmunoproteosómico, directamente o en combinación con recorte N-terminal u otros procesos.

Los siguientes son ejemplos adicionales de secuencias polipeptídicas codificadas que pueden usarse en algunas realizaciones, por ejemplo, pueden estar codificadas por los diversos plásmidos o usarse en los métodos, etc.

**R2**

**MALQSL LQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGR  
PSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPNKRSL LQHLIGLGDAAYSLLQHLI  
GLISPEKEEQYIASLLQHLIGLKRPSIKRSL LQHLIGL**

**P2**

**MNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLLGFLFGWFIKSAQLAGAKGVI  
LYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYR**

**RGIAEAVGLPSIPVHPIRKGLPSIPVHPILVGLPSIPVHPKRISPEKEEQYIAKRGLPSI  
PVHPIKRPSIKRGLPSIPVHPI**

**RP5**

**MISPEKEEQYIASLLQHLIGLKRSL LQHLIGLKRPSIKRSL LQHLIGLALQSL LQHLIG  
LSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCP  
HCGDRTFYDPEPILCPCFMPNKLNLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLL  
LGFLFGWFIKSAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQQRGNIL  
NLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIRKGLPSIPVHPILVGLPSIP  
VHPIKRISPEKEEQYIAKRGLPSIPVHPIKRPSIKRGLPSIPVHPI**

**RP9**

**MISPEKEEQYIASLLQHLIGLKRPSIKRSL LQHLIGLALQSL LQHLIGLSNLTHVLYP  
VPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYD  
PEPILCPCFMPNKLNLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLLGFLFGWFIK  
SAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQQRGNILNLNGAGDPLT  
PGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIRKGLPSIPVHPILVGLPSIPVHPV  
PVHPVSRPSVSRGLPSIPVHPV**

**RP10**

**MISPEKEEQYIASLLQHLIGLALQSL LQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLE  
RLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPNKLNL  
LHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLLGFLFGWFIKSAQLAGAKGVILYSD  
PADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIA  
EAVGLPSIPVHPIRKGLPSIPVHPILVGLPSIPVHPVSRGLPSIPVHPVSRPSVSRGLP  
SIPVHPV**

**RP11**

**MKRSLLQHLIGLKRPSIKRSLQHLIGLALQSLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDI  
 HGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCF  
 MPNKLNLLHETDSA VATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSAQLAGA  
 KGVILYSDPADYFAPGVKSYDPGWNLPGGGVQVQGNLNLNGAGDPLTPGYANE  
 YAYRRGIAEAVGLPSIPVHPVIRKGLPSIPVHPVLVGLPSIPVHPVKRISPEKEEQYIA  
 KRGLPSIPVHPVIRKPSIKRGLPSIPVHPV**

**RP13**

**MKRSLLQHLIGLKRPSIKRSLQHLIGLALQSLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDI  
 HGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCF  
 MPNKLNLLHETDSA VATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSAQLAGA  
 KGVILYSDPADYFAPGVKSYDPGWNLPGGGVQVQGNLNLNGAGDPLTPGYANE  
 YAYRRGIAEAVGLPSIPVHPVLVGLPSIPVHPVKRISPEKEEQYIAKRGLPSIPVHPI  
 KRPSIKRGLPSIPVHPV**

**II. Composiciones inmunogénicas de la presente invención**

- 5 La presente invención contempla el uso de múltiples moléculas expresadas por células cancerosas y por la neovascularización como dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer por inmunoterapia activa. Dichas moléculas incluyen antígenos asociados a tumores (TuAA), que son antígenos expresados por la célula cancerosa misma o asociados a componentes no cancerosos del tumor, tales como la neovascularización asociada a tumores u otros estromas. La determinación de los perfiles de expresión de TuAA puede ayudar a ajustar la afección o tipo de cáncer de un paciente con un agente o régimen inmunoterapéutico apropiado. En realizaciones particulares, se emplean epítomos de los antígenos asociados a tumores PRAME y PSMA para diseñar plásmidos divalentes que puedan desencadenar una respuesta inmunitaria fuerte en un sujeto al que se administran dichos plásmidos como productos terapéuticos del cáncer. Se contemplan también análogos reactivos cruzados de PSMA en las realizaciones de la presente invención.
- 10 El antígeno asociado a tumores PRAME, empleado en la presente invención, es también conocido como MAPE, DAGE y OIP4. PRAME es conocido en la materia como antígeno de cáncer de testículo (CT). Sin embargo, al contrario que muchos antígenos de CT tales como MAGE, GAGE y BAGE, se expresa en leucemia mieloide aguda. PRAME, como TuAA, se da a conocer en la patente de EE.UU. nº 5.830.753. En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona epítomos de PRAME.
- 15 Otro TuAA empleado en la presente invención es el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA). Se encuentra que el PSMA se expresa en gran medida en células de cáncer de próstata. Sin embargo, la expresión de PSMA se observa también en epitelio de próstata normal y en la neovascularización de tumores no prostáticos. El PSMA, como preparación antineovascularización, se da a conocer en las solicitudes de publicación de patente de EE.UU. nº 20030046714 y 20050260234. El PSMA, como TuAA, se describe en la patente de EE.UU. nº 5.538.866. En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona epítomos de PSMA y análogos de los mismos.
- 20 El análogo reactivo cruzado, como se usa en la presente memoria, puede hacer referencia a un péptido que comprende 1-3 sustituciones aminoacídicas y/o una delección o adición aminoacídica en comparación con la secuencia peptídica nativa que induce una función efectora (por ejemplo, citólisis o secreción de citocina) distinguible del fondo, de un CTL reactivo con el péptido nativo. En realizaciones preferidas, la función efectora es al menos un 30, 50, 60, 70 o 80% de la inducida por el péptido nativo.
- 25 En algunas realizaciones de la presente invención, pueden administrarse también péptidos que comprenden la secuencia nativa o análogos (reactivos cruzados) de PSMA como refuerzo peptídico en combinación con los plásmidos de la invención. Se dan a conocer las secuencias peptídicas nativas y análogos peptídicos de PRAME y PSMA en la solicitud de patente de EE.UU. nº 20060057673. Se describen los análogos peptídicos PRAME<sub>425-433</sub> L426Nva, L433Nle y PSMA<sub>288-297</sub> I297V en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2006/0094661, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2006/0063913, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2006/0057673, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2007/0060524 titulada "Análogos peptídicos de PRAME", la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2007/0049533 titulada "Análogos peptídicos de PSMA" y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2007/0060518 titulada "Análogos peptídicos de antígeno de melanoma".
- 30 Como se discute anteriormente, algunas realizaciones se refieren a composiciones inmunogénicas para el tratamiento del cáncer que comprenden plásmidos que codifican epítomos de CTL de PRAME y PSMA y análogos reactivos cruzados de los mismos. Dicha composición inmunogénica puede desencadenar una respuesta inmunitaria mediada por célula robusta o fuerte para orientarse a un cáncer particular, eliminando, erradicando o mejorando así el cáncer en el sujeto.
- 35
- 40

### III. Producto terapéutico de encaminamiento y amplificación para administración

En una realización preferida, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica los epítomos de CTL PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub> o un análogo reactivo cruzado de cualquiera o ambos de estos epítomos. En algunas realizaciones de la invención, puede emplearse un enfoque de sensibilización con plásmido/refuerzo peptídico en el que pueden administrarse el plásmido de ADN recombinante que expresa los epítomos de PRAME y PSMA junto con un péptido sintético tal como un péptido de PRAME o PSMA o análogo del mismo.

La composición inmunogénica de la invención, que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica los epítomos de CTL PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub> o un análogo reactivo cruzado de uno o ambos epítomos, puede suministrarse mediante inyección en nódulo linfático, directamente a los órganos donde se inician y amplifican las respuestas inmunitarias, según un programa de inmunización optimizado. Pueden administrarse realizaciones de la invención actual a pacientes con tejido tumoral que exprese HLA-A2, particularmente HLA-A\*0201. Por lo tanto, puede administrarse la composición inmunogénica que comprende un plásmido y uno o más péptidos o análogos del mismo para tratar un cáncer en un sujeto. Las realizaciones dadas a conocer de la presente invención se refieren a un producto terapéutico de encaminamiento y amplificación para el cáncer que puede usarse para conseguir un ataque divalente o multivalente, ofreciendo la ventaja de aumentar la sensibilidad del tumor ante el ataque.

Por lo tanto, en realizaciones particulares, la presente invención proporciona un producto terapéutico divalente de encaminamiento y amplificación para el tratamiento del cáncer. Dicho producto terapéutico divalente puede orientarse a más de un antígeno en una célula tumoral. En casos en que se orienta a más de un solo antígeno o célula tumoral, la concentración eficaz de producto terapéutico antitumoral aumenta en consecuencia. El ataque a estroma asociado al tumor, tal como vasculatura, puede aumentar la accesibilidad de las células tumorales al agente o agentes que se orientan a ellas. Por tanto, incluso un antígeno que se expresa también en algún tejido normal, puede recibir mayor consideración como antígeno diana si los demás antígenos a que se va a orientar un ataque divalente o multivalente no se expresan también por ese tejido. Los plásmidos de la invención actual pueden usarse junto con plásmidos adicionales que expresen otros epítomos, y los correspondientes péptidos amplificados, para crear protocolos terapéuticos de mayor valencia. Se dan a conocer productos inmunogénicos ejemplares en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. US 2007/0003563, presentada en la fecha de la presente solicitud, titulada "Productos inmunoterapéuticos multivalentes de encaminamiento y amplificación para carcinoma".

Un inmunógeno "de encaminamiento" como se contempla en la presente invención incluye en muchas realizaciones una inducción que confiere estabilidad particular al perfil inmunitario del linaje inducido por linfocitos T.

Como se contempla en la presente invención, el término "amplificar o amplificación", como de una respuesta de linfocitos T, incluye en muchas realizaciones un proceso para aumentar el número de células, el número de células activadas, el nivel de actividad, el índice de proliferación o parámetros similares de los linfocitos T implicados en una respuesta específica.

El protocolo de encaminamiento y amplificación empleado en la presente invención se describe con más detalle en la publicación de patente de EE.UU. n° 20050079152 y en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° US 2006/0165711, cada una titulada "Métodos para desencadenar, potenciar y mantener respuestas inmunitarias contra epítomos limitados a MHC de clase I con fines profilácticos o terapéuticos".

### IV. Modificadores de la respuesta biológica (BRM) o inmunopotenciadores

En algunas realizaciones, la presente invención puede emplear además un modificador de la respuesta biológica (BRM) o inmunopotenciador junto con las composiciones inmunogénicas que comprenden un plásmido de ADN recombinante que codifica los epítomos de CTL PRAME y PSMA, para desencadenar una respuesta inmunitaria. Los inmunopotenciadores o BRM contemplados por la presente invención pueden actuar de manera inmunosupresora o inmunoestimulante para mediar una respuesta inmunitaria. Los inmunopotenciadores o BRM de la presente invención pueden hacer referencia a cualquier molécula que module la actividad del sistema inmunitario, o las células del mismo, mediante una interacción distinta que con un receptor antigénico. Los BRM contemplados en la presente invención pueden incluir además moléculas orgánicas naturales o sintéticas que ejerzan efectos moduladores inmunitarios estimulando las rutas de inmunidad innata.

En realizaciones particulares, la presente invención contempla también inmunopotenciadores o BRM que pueden incluir, pero sin limitación, por ejemplo: citocinas tales como IL-12, IL-18, GM-CSF, ligando de flt3 (flt3L), interferones, TNF- $\alpha$  y similares; quimiocinas tales como IL-8, MIP-3 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MCP-3, RANTES y similares. Otros ejemplos de BRM que pueden utilizarse en la presente invención son moléculas que provocan la producción de citocina o quimiocina, tales como ligandos de receptores de tipo Toll (TLR), peptidoglicanos, LPS o análogos, oligodesoxinucleótidos de CpG no metilados (ODN de CpG); ARNbc tal como ADNbc bacteriano (que contiene motivos de CpG) y ARNbc sintético (poliI:C), en APC y células inmunitarias innatas que se unen a TLR9 y TLR3, respectivamente. Una clase de BRM incluye mayoritariamente moléculas naturales o sintéticas orgánicas pequeñas, que ejercen efectos inmunomoduladores estimulando las rutas de inmunidad innata. Por tanto, pueden emplearse moléculas pequeñas que se unen a TLR, tales como una nueva generación de imidazoquinolinas antivíricas

puramente sintéticas, por ejemplo, imiquimod y resiquimod, que se ha encontrado que estimulan la ruta celular de inmunidad al unirse a TLR7 y 8 (Hemmi, H. *et al.*, Nat. Immunol. 3: 196-200, 2002; Dummer, R. *et al.*, Dermatology 207: 116-118, 2003). Los BRM pueden incluir además coadyuvantes inmunopotenciadores que activan pAPC o linfocitos T incluyendo, por ejemplo: ligandos de receptor de reconocimiento de patrón endocítico (PRR), saponinas de *Quillaja*, tucaresol y similares.

#### V. Métodos de suministro de composiciones de la presente invención

En la presente invención, la administración preferida de la composición inmunogénica que comprende plásmidos de ADN recombinante que codifican los epítomos de CTL PRAME y PSMA, o dichos plásmidos seguidos por uno o más péptidos como uno más refuerzos, es mediante inyección en nódulo linfático. Otros protocolos de inmunización, por ejemplo, que usan plásmidos a dosis distintas de la de iniciación, basados en solo plásmido, o que utilizan otros tipos de reactivos de refuerzo, aunque realizaciones menos preferidas, no se excluyen del alcance de la invención. Las realizaciones de la presente invención engloban plásmidos divalentes que expresan ambos inmunógenos PRAME y PSMA. Al suministrar las composiciones inmunogénicas de la invención a un sujeto necesitado de ello, se prefiere la inyección en nódulo linfático ya que permite el suministro directamente a los órganos donde se inician y amplifican las respuestas inmunitarias según un programa de inmunización optimizado.

Para introducir la composición inmunogénica en el sistema linfático del paciente, se dirige la composición preferiblemente a un vaso linfático, nódulo linfático, bazo u otra parte apropiada del sistema linfático. En algunas realizaciones, se administra cada componente en embolada. En otras realizaciones, se suministran uno o más componentes por infusión, generalmente durante varias horas a varios días. Preferiblemente, la composición se dirige a un nódulo linfático tal como un nódulo inguinal o axilar insertando un catéter o aguja en el nódulo y manteniendo el catéter o aguja a lo largo del suministro. Están disponibles agujas o catéteres adecuados hechos de metal o plástico (por ejemplo, poliuretano, poli(cloruro de vinilo) (PVC), teflón, polietileno y similares). Al insertar el catéter o aguja en el nódulo inguinal, por ejemplo, se punciona el nódulo inguinal por control ultrasonográfico usando una cánula Vialon™ Insyte W™ y un catéter de 24G3/4 (Becton Dickinson, EE.UU.), que se fija usando apósito transparente Tegaderm™ (Tegaderm™, St. Paul, Minn., EE.UU.). Generalmente, un radiólogo experimentado realiza este procedimiento. La localización de la punta del catéter dentro del nódulo inguinal se confirma mediante la inyección de un volumen mínimo de suero salino, que aumenta inmediata y visiblemente el tamaño del nódulo linfático. Este último procedimiento permite la confirmación de que la punta está dentro del nódulo. Este procedimiento puede efectuarse para asegurar que la punta no se desliza fuera del nódulo linfático y puede repetirse diversos días después de la implantación del catéter.

La composición o composiciones terapéuticas de la presente invención pueden administrarse a un paciente de manera coherente con los protocolos de suministro de vacuna estándares que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los métodos de administración de composiciones inmunogénicas de la presente invención que comprenden plásmidos y péptidos o análogos peptídicos de los TuAA PRAME y PSMA incluyen, sin limitación, administración transdérmica, intranodal, perinodal, oral, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal y mucosa, suministro mediante inyección o instilación o inhalación. Se da a conocer un método particularmente útil de suministro de vacuna para desencadenar una respuesta de CTL en la patente australiana nº 739189 y las patentes de EE.UU. nº 6.994.851 y 6.977.074, ambas tituladas "Un método de inducción de una respuesta de CTL".

Pueden tomarse en consideración diversos parámetros para suministrar o administrar una composición inmunogénica a un sujeto. Además, pueden emplearse un régimen de dosificación y programa de inmunización. Generalmente, la cantidad de componentes de la composición terapéutica variará de paciente a paciente y de antígeno a antígeno, dependiendo de factores tales como: la actividad del antígeno en la inducción de una respuesta, el caudal de linfa a través del sistema del paciente, el peso y edad del sujeto, el tipo de enfermedad y/o afección que se esté tratando, la gravedad de la enfermedad o afección, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, la capacidad del sistema inmunitario del individuo de sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, el modo de administración y similares, todos los cuales pueden determinarse fácilmente por el facultativo.

En general, la composición terapéutica puede suministrarse a una velocidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 µl/hora o de aproximadamente 24 a aproximadamente 12.000 µl/día. La concentración del antígeno es tal que se suministren de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 10.000 µg del antígeno durante 24 horas. El caudal está basado en el conocimiento de que cada minuto fluyen de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 µl de fluido linfático a través de un nódulo linfático inguinal adulto. El objetivo es maximizar la concentración local de formulación de vacuna en el sistema linfático. Será necesaria una cierta cantidad de investigación empírica en los pacientes para determinar el nivel más eficaz de infusión para una preparación de vacuna dada en seres humanos.

En realizaciones particulares, la composición inmunogénica de la presente invención puede administrarse como una serie de dosis secuenciales. Dichas dosis pueden ser 2, 3, 4 o más dosis según sea necesario para obtener la respuesta inmunitaria apropiada. En realizaciones adicionales de la presente invención, se contempla que las dosis de composición inmunogénica se administren al cabo de aproximadamente segundos o minutos entre sí en los nódulos linfáticos inguinales derecho o izquierdo. Por ejemplo, el plásmido (sensibilizador) puede inyectarse primero en el nódulo linfático derecho seguido al cabo de segundos o minutos por un segundo plásmido en el nódulo linfático

5 inguinal derecho o izquierdo. En otros casos, puede administrarse una combinación de uno o más plásmidos que expresan uno o más inmunógenos. Se prefiere que la posterior inyección después de la primera inyección en el nódulo linfático sea a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más minutos, pero no más que a aproximadamente 30, 40, 50 o 60 minutos de la primera inyección. Se aplican consideraciones similares a la administración de los dos péptidos individualmente a los nódulos linfáticos derecho e izquierdo. Puede ser deseable administrar las dosis de composición inmunogénica de la invención en un intervalo de días, en que transcurren varios días (1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, o más días) entre administraciones posteriores. En otros casos, puede ser deseable para la administración o administraciones posteriores de las composiciones de la invención administrar mediante inyección en nódulo linfático inguinal bilateral al cabo de aproximadamente 1, 2, 3 o más semanas o al cabo de 1, 2, 3 o más meses después de la administración de la dosis inicial.

La administración puede ser de cualquier manera compatible con la formulación de dosificación y en cantidades tales que sea terapéuticamente eficaz. Una cantidad o dosis eficaz de una composición inmunogénica de la presente invención es aquella cantidad necesaria para proporcionar una respuesta deseada en el sujeto para tratar.

Además de las ya dadas a conocer en esta solicitud, se incorporan expresamente a la presente las siguientes solicitudes como referencia en su totalidad. Se describen métodos útiles para usar los análogos dados a conocer en la inducción, encaminamiento, mantenimiento, modulación y amplificación de respuestas de linfocitos T limitadas a MHC de clase I, y particularmente respuestas de CTL efectoras y de memoria, ante antígeno en las patentes de EE.UU. nº 6.994.851 (07/02/2006) y 6.977.074 (20/12/2005), ambas tituladas "Un método de inducción de una respuesta de CTL" y la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 10/871.707 (nº de pub. 2005 0079152), titulada "Métodos para desencadenar, potenciar y mantener respuestas inmunitarias contra epítomos limitados a MHC de clase I con fines profilácticos o terapéuticos". Los análogos pueden usarse también en investigación para obtener análogos adicionalmente optimizados. Se proporcionan numerosos epítomos constitutivos en las solicitudes de EE.UU. nº de serie 10/117.937, presentada el 4 de abril de 2002 (nº de pub. 20030220239 A1) y 10/657.022 (20040180354) y en la solicitud PCT nº PCT/US2003/027706 (nº de pub. WO04022709A2), presentada el 5 de septiembre de 2003. Los análogos pueden usarse además en cualquiera de los diversos modos descritos en esas solicitudes. Se describe la metodología para usar y suministrar los presentes análogos en las patentes de EE.UU. 6.334.851 y 6.977.074 (expedidas el 20 de diciembre de 2005) y en la solicitud PCT nº PCTUS98/14289 (nº de pub. WO9902183A2), cada una titulada "Un método de inducción de una respuesta de CTL". Se dan a conocer los principios de selección beneficiosos para dichos productos inmunoterapéuticos en las solicitudes de patente de EE.UU. nº 10/026.066 (nº de pub. 20030215425 A1), presentada el 7 de diciembre de 2001, titulada "Sincronización epitópica en células presentadoras de antígeno"; 6.861.234 (expedida el 1 de marzo de 2005, solicitud nº 09/561.074), titulada "Método de descubrimiento de epítomos"; 10/094.699 (nº de pub. 20030046714 A1), presentada el 7 de marzo de 2002, titulada "Preparaciones antineovasculatura para cáncer"; solicitudes nº 10/117.937 (nº de pub. 20030220239 A1) y PCTUS02/11101 (nº de pub. WO02081646A2), ambas presentadas el 4 de abril de 2002, y ambas tituladas "Secuencias epitópicas" y la publicación de solicitud US 2004/0180354 y la solicitud PCT nº PCT/US2003/027706 (nº de pub. WO04022709A2), ambas presentadas el 5 de septiembre de 2003 y ambas tituladas "Secuencias epitópicas". Se dan a conocer aspectos del diseño global de plásmidos de vacuna en las solicitudes de patente de EE.UU. nº 10/292.413 (nº de pub. 20030228634 A1), presentada el 7 de noviembre de 2002, titulada "Vectores de expresión que codifican epítomos de antígenos asociados a diana y métodos para su diseño", 10/225.568 (nº de pub. 2003-0138808), presentada el 20 de agosto de 2002, la solicitud PCT nº PCT/US2003/026231 (nº de pub. WO 2004/018666), presentada el 19 de agosto de 2003, ambas tituladas "Vectores de expresión que codifican epítomos de antígenos asociados a diana" y la patente de EE.UU. nº 6.709.844, titulada "Evitación de intermedios de replicación indeseables en la propagación de plásmido". Se dan a conocer combinaciones antigénicas específicas de beneficio particular para dirigir una respuesta inmunitaria contra cánceres particulares en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2005/0118186, presentada el 17 de junio de 2004 y la solicitud de patente PCT nº PCT/US2004/019571 (nº de pub. WO 2004/112825), tituladas todas "Combinaciones de antígenos asociados a tumores en vacunas para diversos tipos de cánceres". Los antígenos asociados a neovasculatura tumoral (por ejemplo, PSMA, VEGFR2, Tie-2) son también útiles con relación a enfermedades cancerosas, como se da a conocer en la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/094.699 (nº de pub. 20030046714 A1), presentada el 7 de marzo de 2002, titulada "Preparaciones antineovasculatura para cáncer". Se describen enfermedades, organismos y antígenos y epítomos ejemplares asociados a organismos, células y enfermedades diana en la patente de EE.UU. nº 6.977.074 (expedida el 20 de diciembre de 2005), presentada el 2 de febrero de 2001 y titulada "Método de inducción de una respuesta de CTL". Se encuentra la metodología ejemplar en la solicitud de patente de EE.UU. nº 2006-0008468-A1, publicada el 12 de enero de 2006, titulada "Combinaciones de antígenos asociados a tumores en el diagnóstico de diversos tipos de cánceres". Se discute más completamente la integración de las técnicas de diagnóstico para valorar y monitorizar la sensibilidad inmunitaria con métodos de inmunización que incluyen utilizar los presentes análogos en la solicitud de patente de EE.UU. nº US-2005-0287068-A1, publicada el 29 de diciembre de 2005), titulada "Eficacia mejorada de la inmunoterapia activa mediante la integración de métodos de diagnóstico con terapéuticos". Se dan a conocer vectores que codifican el polipéptido inmunogénico en la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/292.413 (nº de pub. 20030228634 A1), presentada el 7 de noviembre de 2002, titulada "Vectores de expresión que codifican epítomos de antígenos asociados a diana y métodos para su diseño". Se dan a conocer análogos, péptidos y métodos adicionales en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20060063913, titulada "Análogos del péptido SSX-2" y la publicación de patente de EE.UU. nº 2006-0057673 A1, publicada el 16 de marzo de 2006, titulada "Análogos

epitópicos” y la publicación de solicitud PCT nº WO/2006/009920, titulada “Análogos epitópicos”, todas presentadas el 17 de junio de 2005. Son otras solicitudes: la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 11/156.253 (nº de publicación 20060063913), presentada el 17 de junio de 2005, titulada “Análogos peptídicos de SSX-2”; la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 11/155.929, presentada el 17 de junio de 2005, titulada “Análogos peptídicos de NY-ESO-1” (nº de publicación 20060094661); la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2006/0165711, presentada el 29 de diciembre de 2005, titulada “Métodos para desencadenar, potenciar y mantener respuestas inmunitarias contra epítomos limitados a MHC de clase I con fines profilácticos o terapéuticos”; la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2008/0124352, presentada el 29 de diciembre de 2005, titulada “Métodos para evitar las células CD4+ en la inducción de una respuesta inmunitaria”; la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2006/0139694, presentada el 29 de diciembre de 2005, titulada “Combinación de antígenos asociados a tumores en composiciones para diversos tipos de cánceres”; la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2006/0159689, presentada el 29 de diciembre de 2005, titulada “Combinaciones de antígenos asociados a tumores en el diagnóstico de diversos tipos de cánceres”.

## VI. Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar las realizaciones preferidas de la invención en el diseño de plásmidos que contienen epítomos inmunogénicos de PSMA y PRAME que son capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria divalente. Debería apreciarse por los expertos en la materia que la metodología dada a conocer en los ejemplos siguientes representa metodologías descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían apreciar, a la vista de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer y seguir obteniendo un resultado parecido o similar.

### Ejemplo 1. Diseño de vectores de expresión de plásmido que codifican inmunógenos

Los plásmidos P2 y R2 (al que también se hace referencia como pCTLR2) contienen elementos de PSMA (expresado en la neovasculatura de un amplio intervalo de carcinomas o por células de carcinoma prostático) y PRAME (expresado por células cancerosas), respectivamente (FIG. 1). Cada inserto engloba un fragmento de secuencia antigénica junto con múltiples copias de un epítomo expresado por células diana y accesible mediante ataque inmunomediado. Flanqueando estos epítomos hay secuencias que codifican aminoácidos conocidos por facilitar el procesamiento y generación de péptidos epitópicos en los compartimentos celulares. Además, el plásmido RP5 engloba elementos tanto de P2 como de R2 con los inmunógenos expresados adjuntos entre sí.

Se construyó el plásmido R2 siguiendo el protocolo de construcción de plásmidos discutido anteriormente y como se da a conocer en la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/691.889, presentada el 17 de junio de 2005, titulada “Análogos epitópicos” y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2007/0060254 (expediente de agente nº MANNK.052A), titulada “Análogos epitópicos de PRAME”. R2, al que también se hace referencia como pCTLR2, es una vacuna de plásmido de ADN recombinante que codifica un polipéptido con un epítomo de CTL específico de HLA A2 de PRAME, SLLQHLIGL, los residuos aminoácidos 425-433, y una región del complejo epitópico de PRAME, los aminoácidos 422-509. Al construir este plásmido, la secuencia de ADN que codifica el polipéptido en el plásmido se dispone bajo el control de la secuencia promotora/potenciadora de citomegalovirus (CMVp) que permite una transcripción eficaz del mensajero para el polipéptido tras la captación por células presentadoras de antígeno. Una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina (poliA de BGH) en el extremo 3' de la secuencia de codificación proporciona una señal de poliadenilación del mensajero para aumentar su estabilidad así como la translocación fuera del núcleo al citoplasma. Para facilitar el transporte de plásmido al núcleo, se ha insertado en el esqueleto del plásmido una secuencia de importación nuclear (NIS) de virus de simio 40. Se inserta por genomanipulación una copia del motivo inmunoestimulador CpG en el plásmido para reforzar adicionalmente las respuestas inmunitarias. Adicionalmente, dos elementos genéticos procarióticos en el plásmido son los responsables de la amplificación en *E. coli*, el gen de resistencia a kanamicina (Kan R) y el origen de replicación bacteriano pMB.

La secuencia aminoacídica (SEQ ID NO:19) del polipéptido codificado de R2 (pCTLR2) es de 150 residuos aminoacídicos de longitud como se muestra a continuación:

**malqslqlhliglsnlthvlypvpleseyedihgtlherlaylharrellcelgrpsmvwlsanpcp**

**hcgdrtydpepilpcpfpmpnkrslqlhliglgdaaysllqhlglispekeeqyiasllqhlglkprskrsllqhlgl**

Los residuos aminoacídicos 2 a 89 corresponden a una región del complejo epitópico que representa PRAME<sub>422-509</sub>. En esta región del complejo epitópico, se ha encontrado una serie de epítomos de CTL específicos de HLA A2 potenciales usando una variedad de algoritmos de predicción de epítomos. Los residuos aminoacídicos 90-150 son una secuencia de liberación epitópica (Synchrotope™) con cuatro copias embebidas del epítomo de CTL PRAME<sub>425-433</sub> (**negrita**). Flanqueando el epítomo de CTL PRAME definido, hay secuencias aminoacídicas cortas que se ha mostrado que desempeñan un papel importante en el procesamiento del epítomo de CTL PRAME. Además, se

inserta por genomanipulación la secuencia aminoacídica ISPEKEEQYIA (correspondiente a los aminoácidos 276-286 de PRAME, en *cursiva*) en esta región de collar de perlas para facilitar la detección basada en anticuerpo de la expresión del polipéptido codificado.

### **Ejemplo 2: Jerarquía dominante/subdominante de elementos inmunogénicos genomanipulados**

- 5 Se realizó un estudio para valorar si la estrategia de insertar por genomanipulación elementos de diferentes antígenos en el mismo vector de expresión crea una jerarquía dominante/subdominante entre esos elementos.

Se inmunizaron cuatro grupos de ratones transgénicos HHD con los plásmidos P2, R2, RP5 o una mezcla de plásmidos P2 y R2 mediante inoculación directa en los nódulos linfáticos inguinales de 25 µg/plásmido en 25 µl de PBS en cada nódulo linfático los días 1, 4, 15 y 18. 10 días después del refuerzo, se estimularon los esplenocitos *ex vivo* con péptido PRAME<sub>425-433</sub> o PSMA<sub>288-297</sub> y se ensayaron frente a linfocitos T2 recubiertos con péptido marcado con <sup>51</sup>Cr a diversas relaciones de efector a célula diana (relación E:T).

15 Brevemente, se marcaron células diana que expresan antígeno sobre su superficie con un isótopo radiactivo de cromo (<sup>51</sup>Cr). Se mezclaron entonces los esplenocitos con la célula diana y se incubaron durante varias horas. Después de la incubación, se recogieron los sobrenadantes y se midió la actividad citolítica en muestras por triplicado usando un contador gamma. La lisis de las células que expresan antígeno libera <sup>51</sup>Cr en el medio. Se calcula la lisis específica de célula comparando la lisis (concretamente, la liberación de cromo) de células diana que expresan el antígeno o antígenos de interés o antígeno o antígenos de control en presencia o ausencia de células efectoras, y se expresa habitualmente como % de lisis específica.

20 Se calculó el porcentaje de lisis corregido para cada concentración de células efectoras usando las cpm medias para cada duplicación de pocillos (**FIG. 2**). Se calculó el porcentaje de lisis específica usando la siguiente fórmula: porcentaje de liberación= 100 x (liberación experimental- liberación espontánea)/(liberación máxima-liberación espontánea). Los datos se presentan como sigue: el eje x muestra la relación de efector a diana, el eje y muestra el correspondiente porcentaje de lisis específica. Los resultados se expresan como % de citotoxicidad específica (se hace referencia al plásmido R2 también como CTLR2).

25 Los resultados muestran que P2 y R2 desencadenan separadamente respuestas inmunitarias citotóxicas significativas. Sin embargo, cuando se integran los inmunógenos de P2 y R2 en el plásmido RP5, se conserva la inmunidad contra el epítipo PRAME mientras que se anula la respuesta ante el epítipo PSMA<sub>288-297</sub>. Esto indica que, desde un punto de vista inmunológico, se establece una jerarquía entre estos dos epítopos. Mezclar los plásmidos P2 y R2 restablece la inmunidad divalente.

### **Ejemplo 3. Estructura de plásmidos adicionales**

Para diseñar vectores de expresión que den como resultado una inmunidad más equilibrada contra ambos epítopos PRAME y PSMA (dominante y subdominante en el contexto de RP5), se diseñó un conjunto de inmunógenos y se incorporó al mismo esqueleto de plásmido empleando diversas combinaciones de los tres métodos siguientes:

- 35
- 1) Se ajustó la relación entre los números de copias del epítipo PRAME<sub>425-433</sub> (dominante) y del epítipo PSMA<sub>288-297</sub> (subdominante) a favor del último.
  - 2) Se colocó el epítipo menos dominante en la posición C-terminal de modo que tuviera el extremo C apropiado independiente del procesamiento proteosómico.
  - 3) Se mutó el epítipo menos dominante (PSMA) (una o múltiples copias en el inserto expresado) para mejorar las propiedades inmunogénicas intrínsecas tales como la unión a, y la semivida en, MHC de clase I.
- 40

La FIG. 3 muestra el diseño de los diversos plásmidos preparados. En la **FIG. 3**, "V" corresponde a epítopos PSMA<sub>266-297</sub> (SEQ ID NO:29) que portan una mutación I297V.

### **Ejemplo 4. Inducción de respuestas divalentes conseguidas por plásmidos que engloban epítopos de diferentes antígenos**

45 Se ensayaron los plásmidos diseñados como se describe en el ejemplo 3 anterior para determinar su capacidad de sensibilizar una respuesta inmunitaria divalente contra los antígenos asociados a tumores PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub>.

50 Se inmunizaron seis grupos de ratones transgénicos HHD (n= 8/grupo) con los plásmidos (RP8, RP9, RP10, RP11, RP12 o RP13) portadores de insertos expuestos en la FIG. 3 mediante inoculación directa en los nódulos linfáticos inguinales de 25 µg en 25 µl de PBS por cada nódulo linfático los días 1 y 4. Siete días después de la última inyección de plásmido, el día 11, se sacrificaron todos los animales inmunizados incluyendo cinco controles no tratados. Se realizó un análisis ELISPOT midiendo la frecuencia de colonias formadoras de puntos (SFC) productoras de IFN-γ como se describe a continuación.

Brevemente, se aislaron el día 11 los bazos de los animales sacrificados y se resuspendieron las células mononucleares, después de centrifugación por densidad (Lympholyte Mammal, Cedarlane Labs, Burlington, N.C.), en medio HL-1. Se incubaron los esplenocitos ( $5 \times 10^5$  o  $2,5 \times 10^5$  células por pocillo) con 10  $\mu\text{g}$  de péptido natural PSMA<sub>288-297</sub> o PRAME<sub>425-433</sub> en pocillos por triplicado de una placa de membrana de filtro de 96 pocillos (placa de 96 pocillos de membrana Multi-screen IP, Millipore, MA). Se incubaron las muestras durante 42 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad antes del desarrollo. Se usó anticuerpo de recubrimiento de IFN- $\gamma$  de ratón (par de anticuerpo de IFN- $\gamma$ , U-CyTech Biosciences, Holanda) como reactivo de recubrimiento antes de la incubación con esplenocitos, seguido del anticuerpo de detección biotinilado acompañante. Se usaron conjugado de GABA y sustratos registrados de U-CyTech Biosciences para el desarrollo de puntos de IFN- $\gamma$ . Se midió la respuesta de CTL en animales inmunizados 24 horas después del desarrollo en el lector de placas AID International usando el software ELISpot Reader versión 3.2.3 calibrado para el análisis de puntos de IFN- $\gamma$ .

Los resultados expuestos en la FIG. 4 muestran el recuento medio de puntos de IFN- $\gamma$  para cada grupo experimental. Los datos se presentan como frecuencia de puntos de IFN- $\gamma$  (que representan una colonia de células secretoras de IFN- $\gamma$ ) por tratamiento, como media de las respuestas animales individuales  $\pm$  el error estándar (EE). Los datos generados por los esplenocitos aislados de ratones inmunizados o no tratados y estimulados con el péptido nativo PSMA<sub>288-297</sub> indicaban que RP12 inducía la inmunidad más fuerte ante el antígeno PSMA<sub>288-297</sub> ( $55,8 \pm 1,6$  puntos de IFN- $\gamma$ ) en comparación con el control no tratado ( $12,8 \pm 2,4$  puntos de IFN- $\gamma$ ) o los demás grupos de tratamiento. Esto representaba una respuesta inmunitaria de PSMA potenciada 5 veces con el plásmido RP12.

Además, los datos generados por esplenocitos aislados de ratones inmunizados o no tratados y estimulados con el péptido nativo PRAME<sub>425-433</sub> demostraron también que los animales inmunizados con RP12 mostraban la respuesta inmunitaria más fuerte ante el antígeno PRAME<sub>425-433</sub> ( $234,5 \pm 3,7$  puntos de IFN- $\gamma$ ) en comparación con los controles no tratados ( $8,5 \pm 2,8$  puntos de IFN- $\gamma$ ) o los demás grupos de tratamiento. Esto representaba una respuesta de PRAME aumentada más de 20 veces con el plásmido RP12.

Globalmente, los resultados expuestos en la FIG. 4 muestran la inducción de una fuerte inmunidad divalente contra ambos epítomos PRAME y PSMA por el plásmido RP12. Se observó cierta inmunidad divalente contra ambos epítomos PRAME y PSMA con RP9 y en menor medida contra RP13, RP10, RP11 y RP8, teniendo todos una representación más potente del epítomo PSMA con respecto al epítomo PRAME en comparación con el plásmido RP5 (FIG. 2). Esta observación es debida aparentemente en parte al uso del análogo I297V de PSMA.

#### **Ejemplo 5. Inducción de una respuesta divalente por el plásmido RP12**

Basándose en la comparación del ejemplo de 4 de los 6 plásmidos (RP8, RP9, RP10, RP11, RP12 y RP13), se seleccionó RP12 para análisis adicional, ya que era el único plásmido que sensibilizaba una respuesta inmunitaria divalente robusta contra ambos PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub>.

Se inmunizaron dos ratones transgénicos HHD representativos con plásmido RP12 portador de un inserto (expuesto en la FIG. 3) mediante inoculación directa en los nódulos linfáticos inguinales de 25  $\mu\text{g}$  en 25  $\mu\text{l}$  de PBS de cada nódulo linfático los días 1, 4, 15 y 18. Diez días después de la última inyección de plásmido, se midió la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos de epítomo PRAME y PSMA mediante tinción tetramérica de células mononucleares de sangre periférica y cotinción para expresión de CD8.

Brevemente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica después de centrifugación por densidad (Lympholyte Mammal, Cedarlane Labs) y se tiñeron con tetrámero HLA-A\*0201 PRAME MHC (Beckman Coulter, T02001) y tetrámero HLA-A\*0201 PSMA MHC (Beckman Coulter, T02001). Se cotiñeron entonces estas células usando anticuerpo monoclonal de rata anti-ratón CD8a (Ly-2) conjugado con FITC (BD Biosciences, 553031). Se recogieron los datos usando un citómetro de flujo BD FACS Calibur y se analizaron usando el software Cellquest, clasificando la población de linfocitos y calculando el porcentaje de células positivas de tetrámero en la población de CD8+.

Los resultados expuestos en la FIG. 5 muestran que después de la inmunización con plásmido intranodal, el plásmido RP12 desencadenaba inmunidad dual, y la frecuencia de linfocitos T específicos de PRAME<sub>425-433</sub> era varias veces mayor que la de linfocitos T específicos del epítomo subdominante de PSMA.

#### **Ejemplo 6. Respuesta inmunitaria divalente en ratones sensibilizados con plásmido PRAME y PSMA y reforzados con péptido**

Para determinar si la inmunización con los plásmidos RP12 y RP8 podría inducir una respuesta divalente contra los antígenos asociados a tumor PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub>, después de refuerzo peptídico con el análogo PSMA<sub>288-297</sub> I297V (SEQ ID NO:7), se realizó un análisis tetramérico de los animales inmunizados.

Se inmunizaron ratones transgénicos HHD con los plásmidos RP8 o RP12 portadores de insertos expuestos en la FIG. 3 mediante inoculación directa en los nódulos linfáticos inguinales de 100  $\mu\text{g}$  en 25  $\mu\text{l}$  de PBS por cada nódulo linfático los días 1, 4, 15 y 18. Los días 29 y 32, se reforzaron los ratones con 25  $\mu\text{g}$  de análogo peptídico de PSMA<sub>288-297</sub> (I297V). Un día antes del inicio del refuerzo peptídico y diez días después de la terminación del refuerzo de plásmido, se midió la frecuencia de linfocitos T específicos de epítomo PRAME y PSMA mediante tinción

tetramérica (como se describe anteriormente) y se comparó con los resultados tetraméricos siete días después del último refuerzo peptídico.

Los resultados mostrados en la **FIG. 6**, como media  $\pm$  EE de la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos, mostraban que el plásmido RP12 desencadena una inmunidad específica de PSMA ligeramente mayor que RP8 antes del refuerzo peptídico. Además, en ambos casos de RP12 y RP8, se encontró que la inmunidad contra PRAME era dominante antes del refuerzo peptídico. Sin embargo, después del refuerzo con el epítipo subdominante PSMA, la respuesta inmunitaria contra PRAME y PSMA exhibía un perfil más equilibrado, particularmente en el caso de RP12, indicando el beneficio de las estrategias para desencadenar respuestas inmunitarias equilibradas contra epítipos de diferente jerarquía inmunitaria.

- 5 La **FIG. 6B** muestra las respuestas inmunitarias a PRAME y PSMA en tres ratones representativos de cada grupo e ilustra adicionalmente la respuesta divalente potenciada desencadenada por el plásmido RP12 y el refuerzo peptídico con PSMA (I297V).

**Ejemplo 7. Respuesta inmunitaria divalente después de refuerzo peptídico con PSMA y posterior refuerzo peptídico con PRAME**

- 15 Se examinó si la inmunización con los plásmidos RP12 y RP8 podría inducir una respuesta divalente contra los epítipos PRAME<sub>425-433</sub> y PSMA<sub>288-297</sub> de estos antígenos asociados a tumores, después de un primer refuerzo peptídico con el análogo PSMA<sub>288-297</sub> I297V y un segundo refuerzo con el análogo peptídico PRAME<sub>425-433</sub> L426Nva, L433Nle.

- 20 Se inmunizaron los ratones con 4 inyecciones de plásmido RP8 o RP12 (4 mg/ml) mediante inoculación directa en los nódulos linfáticos inguinales los días 1, 4, 15 y 18. Los días 29 y 32, se reforzaron los ratones con análogo peptídico de PSMA<sub>288-297</sub> I297V (0,5 mg/ml), seguido de un segundo refuerzo los días 42 y 59 con análogo peptídico de PRAME<sub>425-433</sub> L426Nva, L433Nle a 0,5 mg/ml y 0,05 mg/ml respectivamente. Se sacrificaron los ratones y se realizó un análisis ELISPOT (FIG. 7) como sigue.

- 25 Brevemente, se aislaron los bazos diez días después de la última inyección de péptido PRAME<sub>425-433</sub> L426Nva, L433Nle de los animales sacrificados y se resuspendieron las células mononucleares, después de centrifugación por densidad (Lympholyte Mammal, Cedarlane Labs, Burlington, N.C.), en medio HL-1. Se incubaron los esplenocitos ( $2 \times 10^5$  células por pocillo) con 10  $\mu$ g de péptido natural PSMA<sub>288-297</sub> o PRAME<sub>425-433</sub> en pocillos por triplicado de una placa de membrana de filtro de 96 pocillos (placa de 96 pocillos de membrana Multi-screen IP, Millipore, MA). Se incubaron las muestras durante 72 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad antes del desarrollo. Se usó anticuerpo de recubrimiento de IFN- $\gamma$  de ratón (par de anticuerpo de IFN- $\gamma$ , U-CyTech Biosciences, Holanda) como reactivo de recubrimiento antes de la incubación con esplenocitos, seguido del anticuerpo de detección biotinilado acompañante. Se usaron conjugado de GABA y sustratos registrados de U-CyTech Biosciences para el desarrollo de puntos de IFN- $\gamma$ . Se midió la respuesta de CTL en animales inmunizados 24 horas después del desarrollo en el lector de placas AID International usando el software ELISpot Reader versión 3.2.3 calibrado para el análisis de puntos de IFN- $\gamma$ .

Los resultados muestran que el plásmido RP12 desencadena una mayor inmunidad específica de PSMA que RP8 a todas las dosis ensayadas. Para ambos plásmidos RP12 y RP8, se encontró que la inmunidad contra PRAME era dominante a todas las dosis ensayadas. También el plásmido RP12 mostraba una fuerte respuesta inmunitaria equilibrada contra PRAME y PSMA después del refuerzo con epítipos de PSMA y PRAME.

40

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> MANNKIND CORPORATION Qiu, Zhiyong Bot, Adrian

10 <120> Métodos y composiciones para desencadenar respuestas inmunitarias multivalentes contra epítomos dominantes y subdominantes expresados en células cancerosas y estroma tumoral

10 <130> MANNK.053VPC

15 <150> 60/691,579

15 <151> 17-06-2005

15 <160> 18

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

20 <210> 1

20 <211> 3950

20 <212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

25 <220>

25 <223> Péptido genomanipulado

25 <400> 1

cgttgacatt	gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	60
agcccatata	tgaggttccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgcc	tggtgaccg	120
ccaacgacc	cccgccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgccaata	180
gggactttcc	attgacgtca	atgggtggag	tatttacggt	aaactgcca	cttggcagta	240
catcaagtgt	atcatatgcc	aagtacggcc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaattggccc	300
gcctggcatt	atccccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	360
gtattagtca	tcgctattac	catgggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	420
tagcggtttg	actcacgggg	atltccaagt	ctccaccca	ttgacgtcaa	tgaggatttg	480
ttttggcacc	aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgctgta	acaactccgc	cccattgacg	540
caaatgggcg	gtaggcgtgt	acgggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	600
agagaaccca	ctgcttactg	gcttatcgaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	660
gctggctagc	gtttaaactt	aagccaccat	gaagaggcca	agtattaaga	ggagtctcct	720
gcaacacctc	atcgggcttg	ccctgcagag	tctcttgag	cacctcatcg	ggctgagcaa	780
tctgaccac	gtgctgtatc	ctgtccccct	ggagagttat	gaggacatcc	atggtaccct	840
ccacctggag	aggcttgcc	atctgcatgc	caggctcagg	gagttgctgt	gtgagttggg	900
gcggcccagc	atggctctggc	ttagtgccaa	cccctgtcct	cactgtgggg	acagaacctt	960
ctatgacctg	gagccatcc	tgtgcccctg	tttcatgct	aacaagctta	atctccttca	1020
cgaaaccgac	tcggctgtgg	ccaccgcgcg	ccgcccgcgc	tggctgtgcg	ctggggcgct	1080
ggtgctggcg	ggtggcttct	ttctcctcgg	cttctctctc	gggtggttta	taaaaagcgc	1140
tcagctggca	ggggccaaag	gagtcattct	ctactccgac	cctgctgact	actttgctcc	1200
tggggtgaag	tcctatccag	atgggttgaa	tcttctcggg	ggtggtgtcc	agcgtggaaa	1260
tatcctaaat	ctgaatggtg	caggagacc	tctcacacca	ggttaccag	caaatgaata	1320
tgttatagg	cgtggaattg	cagaggetgt	tggctctcca	agtattcctg	ttcatcctat	1380
tcgaaagggc	cttccaagta	ttcctgttca	tccaattctc	gtcggctctc	caagtattcc	1440
tgttcatcca	attaagcgca	tttccccgga	gaaggaagag	cagtatatcg	ccaagcgcgg	1500
tcttccaagt	attcctgttc	atccaattaa	gaggccaagt	attaagaggg	gtcttccaag	1560
tattcctggt	catccagttt	agtgagaatt	ctgcagatat	ccatcacact	ggcggccgct	1620

```

cgagtctaga gggcccgttt aaaccgcgtg atcagcctcg actgtgcctt ctagttagca 1680
gccatctggt gtttgeccct cccccgtgcc ttccttgacc ctggaagggt ccaactccac 1740
tgtcctttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt ctgagtaggt gtcattctat 1800
tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca 1860
tgctggggat gcggtgggct ctatggcttc tactgggctg ttttatggac agcaagcgaa 1920
ccggaattgc cagctggggc gccctctggt aaggttggga agccctgcaa agtaaactgg 1980
atggctttct tgccgccaag gatctgatgg cgcaggggat caagctctga tcaagagaca 2040
ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct 2100
tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc 2160
gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc 2220
ggtgccctga atgaactgca agacgaggca gcgcggtat cgtggctggc cagcagggc 2280
gttctttgcg cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg 2340
ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgcccga gaaagtatcc 2400
atcatggctg atgcaatgcg gcggtgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac 2460
caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcggg tgggaagccgg tcttgtcgat 2520
caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcagc cccaactggt cgccaggctc 2580
aaggcgagca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacc atggcgatgc ctgcttgccg 2640
aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg 2700
gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc 2760
gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgatcc gcagcgcac 2820
gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgaattatta acgcttaca tttcctgatg 2880
cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatcagggt gcacttttcg 2940
gggaaatgtg cgcggaacct ctatgtgttt attttctaa atacattcaa atatgtatcc 3000
gctcatgaga caataacctt gataaatgct tcaataatag cacgtgctaa aacttcattt 3060
ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctccggaaga gtcaagaaca 3120
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcggttt 3180
tccataggct ccgccccctt gacgagcacc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 3240
gaaaccgcac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc ctctgctgct 3300
ctcctgttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccc ctttctccct tcgggaagcg 3360
tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca 3420
agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccagccg ctgcgcctta tccgtaact 3480
atcgtcttga gtccaacctg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 3540
acaggattag cagagcgagg tatgtaggag gtgctacaga gttcttgaag tggtaggcta 3600
actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct 3660
tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt 3720
ttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 3780
tctttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggctc 3840
ggccggaaac gtttggttgc tgactaattg agatgcatgc tttgcatact tctgctgct 3900
ggggagcctg gggactttcc acacctcgcg atgtacgggc cagatatacg 3950

```

<210> 2  
 <211> 297  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado

10  
 <400> 2

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

Glu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Gly	Arg	Pro	Ser	Met	Val	Trp	Leu	Ser	Ala
65					70					75					80
Asn	Pro	Cys	Pro	His	Cys	Gly	Asp	Arg	Thr	Phe	Tyr	Asp	Pro	Glu	Pro
				85					90					95	
Ile	Leu	Cys	Pro	Cys	Phe	Met	Pro	Asn	Lys	Leu	Asn	Leu	Leu	His	Glu
			100					105					110		
Thr	Asp	Ser	Ala	Val	Ala	Thr	Ala	Arg	Arg	Pro	Arg	Trp	Leu	Cys	Ala
		115					120					125			
Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Phe
	130					135					140				
Gly	Trp	Phe	Ile	Lys	Ser	Ala	Gln	Leu	Ala	Gly	Ala	Lys	Gly	Val	Ile
145				150						155					160
Leu	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Pro	Gly	Val	Lys	Ser	Tyr
				165					170					175	
Pro	Asp	Gly	Trp	Asn	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Arg	Gly	Asn	Ile
			180					185					190		
Leu	Asn	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Pro	Gly	Tyr	Pro	Ala
		195					200					205			
Asn	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gly	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Gly	Leu	Pro
	210						215					220			
Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Ile	Arg	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val
225				230						235					240
His	Pro	Ile	Leu	Val	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Ile	Lys
				245					250					255	
Arg	Ile	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Lys	Arg	Gly	Leu
			260					265					270		
Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Ile	Lys	Arg	Pro	Ser	Ile	Lys	Arg	Gly
		275					280						285		
Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Val							
	290						295								

<210> 3  
 <211> 3884  
 5 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado

10

<400> 3  
 cgttgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat 60  
 agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg 120  
 cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata 180  
 gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgcca cttggcagta 240  
 catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc 300  
 gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac 360  
 gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggctgga 420  
 tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg 480  
 ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg 540  
 caaatgggcg gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact 600  
 agagaaccca ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa 660  
 gctggctagc gtttaaactt aagccaccat gaatctcctt cacgaaaccg actcggctgt 720  
 ggccaccgcg cgccgcccgc gctggctgtg cgctggggcg ctgggtgctg cgggtggctt 780  
 ctttctcctc ggcttctctt tcgggtggtt tataaaaagc gctcagctgg caggggcca 840  
 aggagtcatt ctctactccg accctgctga ctactttgct cctggggtga agtcctatcc 900  
 agatggtttg aatcttctct gaggtggtgt ccagcgtgga aatatcctaa atctgaatgg 960

```

tgcaggagac cctctcacac caggttaccc agcaaatgaa tatgcttata ggcgtggaat 1020
tgcagaggct gttggctctc caagtattcc tgttcaccc attgccctgc agagtctctt 1080
gcagcacctc atcgggctga gcaatctgac ccacgtgctg taccctgtcc ccctggagag 1140
ttatgaggac atccatggta ccctccacct ggagaggctt gcctatctgc atgccaggct 1200
cagggagttg ctgtgtgagt tggggcggcc cagcatggtc tggcttagtg ccaaccctg 1260
tcctcactgt ggggacagaa cottctatga cccggagccc atcctgtgcc cctgtttcat 1320
gcctaacaag cgatcgctcc tgcaaacct catcgggctg ggggacgccc cctacagtct 1380
cctgcaacac ctcatcgggc tgatttcccc ggagaaggaa gagcagtata tcgccagtct 1440
cctgcaacac ctcatcgggc tgaagaggcc aagtattaag aggggtcttc caagtattcc 1500
tgttcaccca gtttagtgag aattctgcag atatccatca cactggcggc cgctcgagtc 1560
tagagggccc gtttaaacc gctgatcagc ctcgactgtg cottctagtt gccagccatc 1620
tgttgtttgc cctcccccg tgccttctt gaccctggaa ggtgccactc cactgtcct 1680
ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg 1740
gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattgctg 1800
ggatgcggtg ggctctatgg cttctactgg gcggttttat ggacagcaag cgaaccggaa 1860
ttgccagctg gggcgccctc tggtaaggtt ggggaagcct gcaaagtaa ctggatggct 1920
ttcttgccgc caaggatctg atggcgcagg ggatcaagct ctgatcaaga gacaggatga 1980
ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc cgcttggggtg 2040
gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga tgccgcccgtg 2100
ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccgggt ctttttgtca agaccgacct gtccgggtgcc 2160
ctgaatgaac tgcaagacga ggcagcgcgg ctatcgtggc tggccacgac gggcgttcct 2220
tgcgagctg tgctcgactg tgctactgaa gcgggaaggg actggctgct attgggcgaa 2280
gtgcccgggc aggatctcct gtcatctcac cttgctcctg ccgagaaagt atccatcatg 2340
gctgatgcaa tgcgcggtc gcatacgtt gatccggcta cctgcccatt cgaccaccaa 2400
gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat 2460
gatctggagc aagagcatca ggggctcgcg ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg 2520
agcatgcccg acggcgagga tctcgtcgtg acccatggcg atgcctgctt gccgaatac 2580
atggtggaaa atggcgcctt ttctggattc atcgactgtg gccggctggg tgtggcggac 2640
cgctatcagg acatagcgtt ggctaccggt gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg 2700
gctgaccgct tcctcgtgct ttacggatc gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc 2760
tatcgccttc ttgacgagtt cttctgaatt attaaccgtt acaatttctt gatgcggtat 2820
tttctcctta cgcactctgt cggtatttca caccgcatca ggtggcactt ttccgggaaa 2880
tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaataatg atccgctcat 2940
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atagcacgtg ctaaaacttc atttttaatt 3000
taaaaggatc taggtgaaga tctttttga taatctccgg aagagtcaag aacatgtgag 3060
caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 3120
ggctccgccc ccctgacgag catcacaana atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc 3180
cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 3240
ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgctttctt cccttcggga agcgtggcgc 3300
tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg 3360
gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc 3420
ttgagtccaa cccggttaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 3480
ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg 3540
gctacactag aagaacagta tttggatctt gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 3600
aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg 3660
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 3720
ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaa actcacgtta agggattttg gtccggcccg 3780
aaacgtttgg ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag 3840
cctggggact ttccacacct cgcgatgtac gggccagata tacg 3884

```

<210> 4  
 <211> 275  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado  
 10 <400> 4

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

<210> 5  
 <211> 9  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo Sapien

<400> 5  
 Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu  
 1 5

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapien

<400> 6  
 Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile  
 1 5 10

<210> 7

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Péptido genomanipulado

<400> 7  
**Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Val**  
 1 5 10

10 <210> 8  
 <211> 66  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Péptido genomanipulado

<400> 8  
**Arg Lys Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Leu Val Gly Leu**  
 1 5 10 15  
**Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Lys Arg Ile Ser Pro Glu Lys Glu**  
 20 25 30  
**Glu Gln Tyr Ile Ala Lys Arg Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro**  
 35 40 45  
**Ile Lys Arg Pro Ser Ile Lys Arg Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His**  
 50 55 60  
**Pro Val**  
 65

20 <210> 9  
 <211> 62  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado

30 <400> 9  
**Lys Arg Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Gly Asp Ala Ala Tyr**  
 1 5 10 15  
**Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu**  
 20 25 30  
**Gln Tyr Ile Ala Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Lys Arg Pro**  
 35 40 45  
**Ser Ile Lys Arg Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Val**  
 50 55 60

35 <210> 10  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado

40 <400> 10

```

Met Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Ser Asn Leu
 1                    5                    10                    15
Thr His Val Leu Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu Asp Ile His
      20                    25                    30
Gly Thr Leu His Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala Arg Leu Arg
      35                    40                    45
Glu Leu Leu Cys Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp Leu Ser Ala
      50                    55                    60
Asn Pro Cys Pro His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Pro Glu Pro
65                    70                    75                    80
Ile Leu Cys Pro Cys Phe Met Pro Asn Lys Arg Ser Leu Leu Gln His
      85                    90                    95
Leu Ile Gly Leu Gly Asp Ala Ala Tyr Ser Leu Leu Gln His Leu Ile
      100                    105                    110
Gly Leu Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Ser Leu Leu
      115                    120                    125
Gln His Leu Ile Gly Leu Lys Arg Pro Ser Ile Lys Arg Ser Leu Leu
      130                    135                    140
Gln His Leu Ile Gly Leu
145                    150

```

5 <210> 11  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido genomanipulado

<400> 11

```

Met Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg Arg
 1                    5                    10                    15
Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe Phe
      20                    25                    30
Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ala Gln Leu Ala
      35                    40                    45
Gly Ala Lys Gly Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala
      50                    55                    60
Pro Gly Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly
65                    70                    75                    80
Val Gln Arg Gly Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu
      85                    90                    95
Thr Pro Gly Tyr Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala
      100                    105                    110
Glu Ala Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Arg Lys Gly
      115                    120                    125
Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Leu Val Gly Leu Pro Ser Ile
      130                    135                    140
Pro Val His Pro Ile Lys Arg Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr
145                    150                    155                    160
Ile Ala Lys Arg Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Lys Arg
      165                    170                    175
Pro Ser Ile Lys Arg Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile
      180                    185                    190

```

15

<210> 12  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado  
 <400> 12

```

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

10

<210> 13  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Péptido genomanipulado

<400> 13

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

5

<210> 14

<211> 304

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido genomanipulado

15 <400> 14

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

<210> 15  
 <211> 288  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado

10 <400> 15  
 Met Ile Ser Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Ser Leu Leu Gln  
 1 5 10 15  
 His Leu Ile Gly Leu Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly

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

<210> 16  
 <211> 308  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado

10 <400> 16  
 Met Lys Arg Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Lys Arg Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Lys Arg Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Ala Leu Gln Ser  
 20 25 30  
 Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Ser Asn Leu Thr His Val Leu Tyr  
 35 40 45  
 Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu Asp Ile His Gly Thr Leu His Leu  
 50 55 60  
 Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro His  
 85 90 95  
 Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro Cys

			100					105					110		
Phe	Met	Pro	Asn	Lys	Leu	Asn	Leu	Leu	His	Glu	Thr	Asp	Ser	Ala	Val
		115					120					125			
Ala	Thr	Ala	Arg	Arg	Pro	Arg	Trp	Leu	Cys	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Leu
	130					135					140				
Ala	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Phe	Gly	Trp	Phe	Ile	Lys
145					150					155					160
Ser	Ala	Gln	Leu	Ala	Gly	Ala	Lys	Gly	Val	Ile	Leu	Tyr	Ser	Asp	Pro
				165					170					175	
Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Pro	Gly	Val	Lys	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Trp	Asn
			180					185					190		
Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Arg	Gly	Asn	Ile	Leu	Asn	Leu	Asn	Gly
		195					200					205			
Ala	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Pro	Gly	Tyr	Pro	Ala	Asn	Glu	Tyr	Ala	Tyr
	210					215					220				
Arg	Arg	Gly	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His
225					230					235					240
Pro	Ile	Arg	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Val	Leu	Val
				245					250					255	
Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Val	Lys	Arg	Ile	Ser	Pro	Glu
			260					265					270		
Lys	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Lys	Arg	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val
		275					280					285			
His	Pro	Ile	Lys	Arg	Pro	Ser	Ile	Lys	Arg	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro
	290					295					300				
Val	His	Pro	Val												
305															

<210> 17  
 <211> 275  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado

<400> 17

Met	Asn	Leu	Leu	His	Glu	Thr	Asp	Ser	Ala	Val	Ala	Thr	Ala	Arg	Arg
1				5					10					15	
Pro	Arg	Trp	Leu	Cys	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Gly	Gly	Phe	Phe
			20					25					30		
Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Phe	Gly	Trp	Phe	Ile	Lys	Ser	Ala	Gln	Leu	Ala
		35					40					45			
Gly	Ala	Lys	Gly	Val	Ile	Leu	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala
	50					55				60					
Pro	Gly	Val	Lys	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Trp	Asn	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly
65					70					75					80
Val	Gln	Arg	Gly	Asn	Ile	Leu	Asn	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly	Asp	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Pro	Gly	Tyr	Pro	Ala	Asn	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gly	Ile	Ala
			100					105					110		
Glu	Ala	Val	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Ile	Ala	Leu	Gln
		115					120					125			
Ser	Leu	Leu	Gln	His	Leu	Ile	Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	His	Val	Leu
	130					135					140				
Tyr	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	His	Gly	Thr	Leu	His

```

145          150          155          160
Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys
      165          170          175
Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro
      180          185          190
His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro
      195          200          205
Cys Phe Met Pro Asn Lys Arg Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
      210          215          220
Gly Asp Ala Ala Tyr Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Ile Ser
225          230          235          240
Pro Glu Lys Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Ser Leu Leu Gln His Leu Ile
      245          250          255
Gly Leu Lys Arg Pro Ser Ile Lys Arg Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val
      260          265          270
His Pro Val
      275

```

<210> 18  
 <211> 296  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido genomanipulado

10 <400> 18

```

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

```

225					230					235				240	
Pro	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Val	Lys	Arg
				245					250					255	
Ile	Ser	Pro	Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Lys	Arg	Gly	Leu	Pro
			260					265					270		
Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Ile	Lys	Arg	Pro	Ser	Ile	Lys	Arg	Gly	Leu
		275					280					285			
Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Val								
	290						295								

1

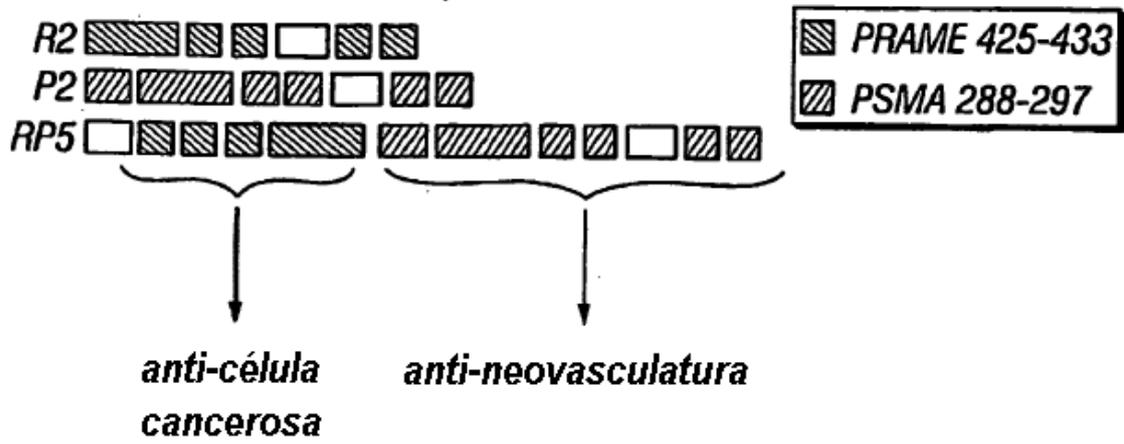
**REIVINDICACIONES**

1. Un constructo de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una o más copias de un análogo reactivo cruzado del epítipo de CTL PSMA<sub>288-297</sub> (SEQ ID NO:6) que comprende 1-3 sustituciones, en el que el análogo reactivo cruzado comprende una sustitución I297V, y una o más copias del epítipo de CTL PRAME<sub>425-433</sub> (SEQ ID NO:5) o un análogo reactivo cruzado del mismo que comprende 1-3 sustituciones, en el que el polipéptido no comprende un antígeno de PSMA completo ni un antígeno de PRAME completo, en el que ambos epítipos están codificados en una secuencia de liberación, y
  - (i) en el que la secuencia de liberación de ambos epítipos de PRAME y PSMA está localizada en la parte C-terminal del polipéptido codificado y en el que el polipéptido codificado es de SEQ ID NO:4; o
  - (ii) en el que el polipéptido codificado es de SEQ ID NO:14.
2. El constructo de ácido nucleico de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de importación nuclear.
3. El constructo de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, que comprende además un promotor.
4. El constructo de ácido nucleico de la reivindicación 3, en el que el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV).
5. El constructo de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una secuencia de poliA.
6. El constructo de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además uno o más motivos inmunoestimulantes CpG.
7. Una composición inmunogénica que comprende el constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. El constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en el tratamiento de un individuo que tiene cáncer.
9. El constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso de la reivindicación 8, en el que el constructo de ácido nucleico se administra por vía intranodal.
10. El constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso de las reivindicaciones 8 o 9, en el que el individuo tiene un cáncer que expresa PRAME, PSMA o ambos en células neoplásicas o células de neovasculatura asociada a tumores.
11. La composición inmunogénica de la reivindicación 7 para uso en el tratamiento de un individuo que tiene cáncer.
12. La composición inmunogénica de la reivindicación 7 para el uso de la reivindicación 11, en la que la composición inmunogénica se administra por vía intranodal.
13. La composición inmunogénica de la reivindicación 7 para el uso de la reivindicación 11 o 12, en la que el individuo tiene un cáncer que expresa PRAME, PSMA o ambos en células neoplásicas o células de neovasculatura asociada a tumores.
14. El constructo de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria orientada a células de neovasculatura asociada a tumores.
15. El constructo de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso de la reivindicación 14, en el que las células de vasculatura asociada a tumores exponen PSMA.
16. El constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8-10 y 14-15 para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un individuo que tiene cáncer, en el que el constructo de ácido nucleico se administra por vía intranodal.
17. El constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8-10 y 14-15 para el uso de la reivindicación 16, en el que el individuo tiene un cáncer que expresa PRAME en células cancerosas y PSMA en células de vasculatura asociada a tumores.
18. El constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8-10 y 14-15 para el uso de la reivindicación 16, en el que el individuo tiene un cáncer que expresa PRAME, PSMA o ambos en células neoplásicas o de neovasculatura asociada a tumores.

19. Uso de un constructo de ácido nucleico en la preparación de un medicamento para uso en la inmunización mediante inducción de una respuesta inmunitaria con dicho constructo de ácido nucleico y amplificación de la respuesta inmunitaria con al menos un péptido epitópico o análogo del mismo correspondiente a un epítipo codificado por dicho constructo de ácido nucleico,

- 5 en el que el constructo de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una o más copias de un análogo reactivo cruzado del epítipo de CTL PSMA<sub>288-297</sub> (SEQ ID NO:6) que comprende 1-3 sustituciones, en el que el análogo reactivo cruzado comprende una sustitución I297V, y una o más copias del epítipo de CTL PRAME<sub>425-433</sub> (SEQ ID NO:5) o un análogo reactivo cruzado del mismo que comprende 1-3 sustituciones, en el que el polipéptido no comprende un antígeno de PSMA completo ni un antígeno de PRAME completo, en el que ambos epítipos están codificados en una secuencia de liberación.
- 10

**Diseño de plásmido**



**FIG. 1**

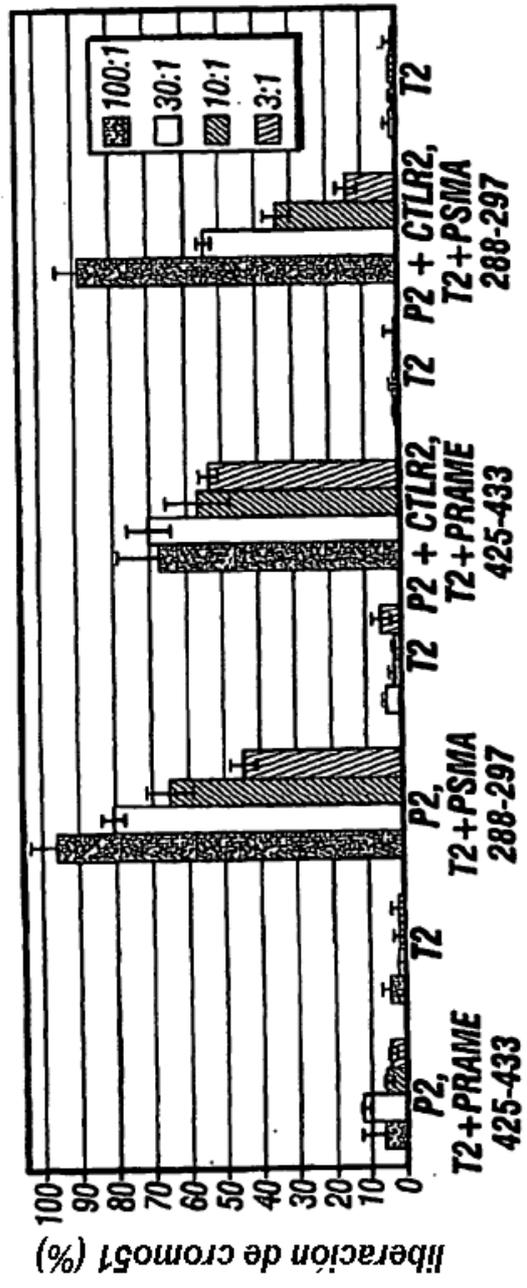
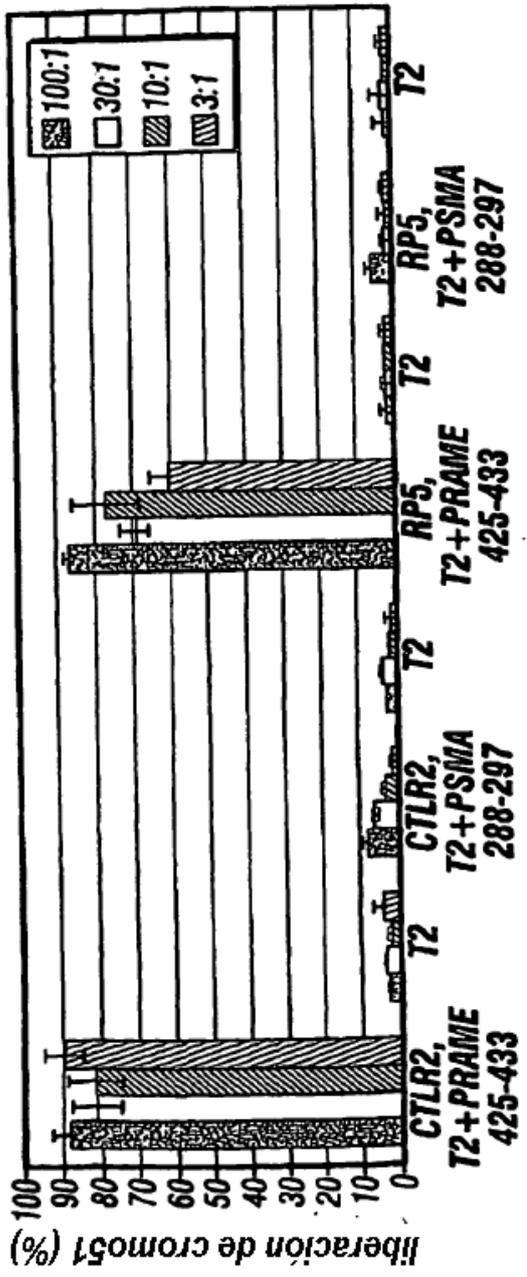
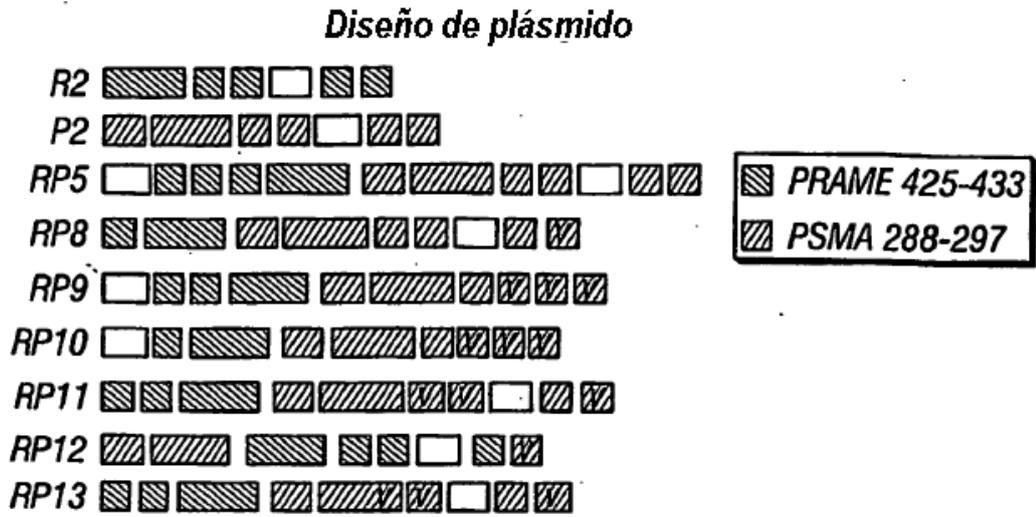
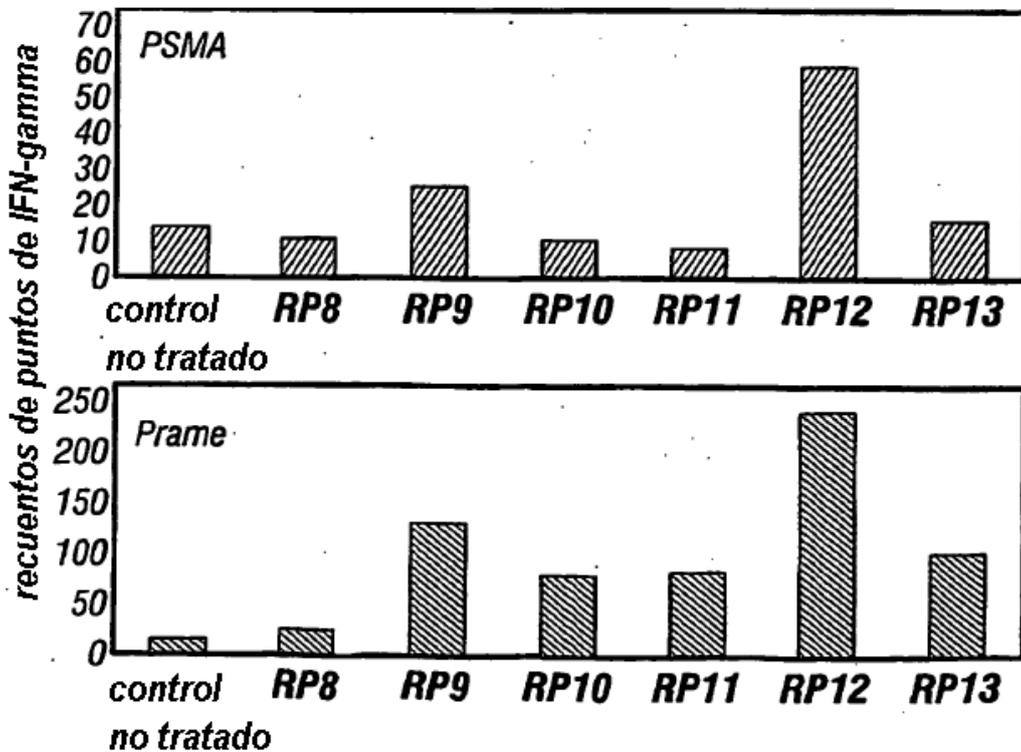


FIG. 2



**FIG. 3**

**Análisis de ELISPOT de IFN- $\gamma$  de ratones inmunizados con plásmido divalente PRAME 425-433 y PSMA 288-297**



**FIG. 4**

Ánalysis tetramérico multicolor dual PRAME/PSMA después de inmunización con plásmido divalente

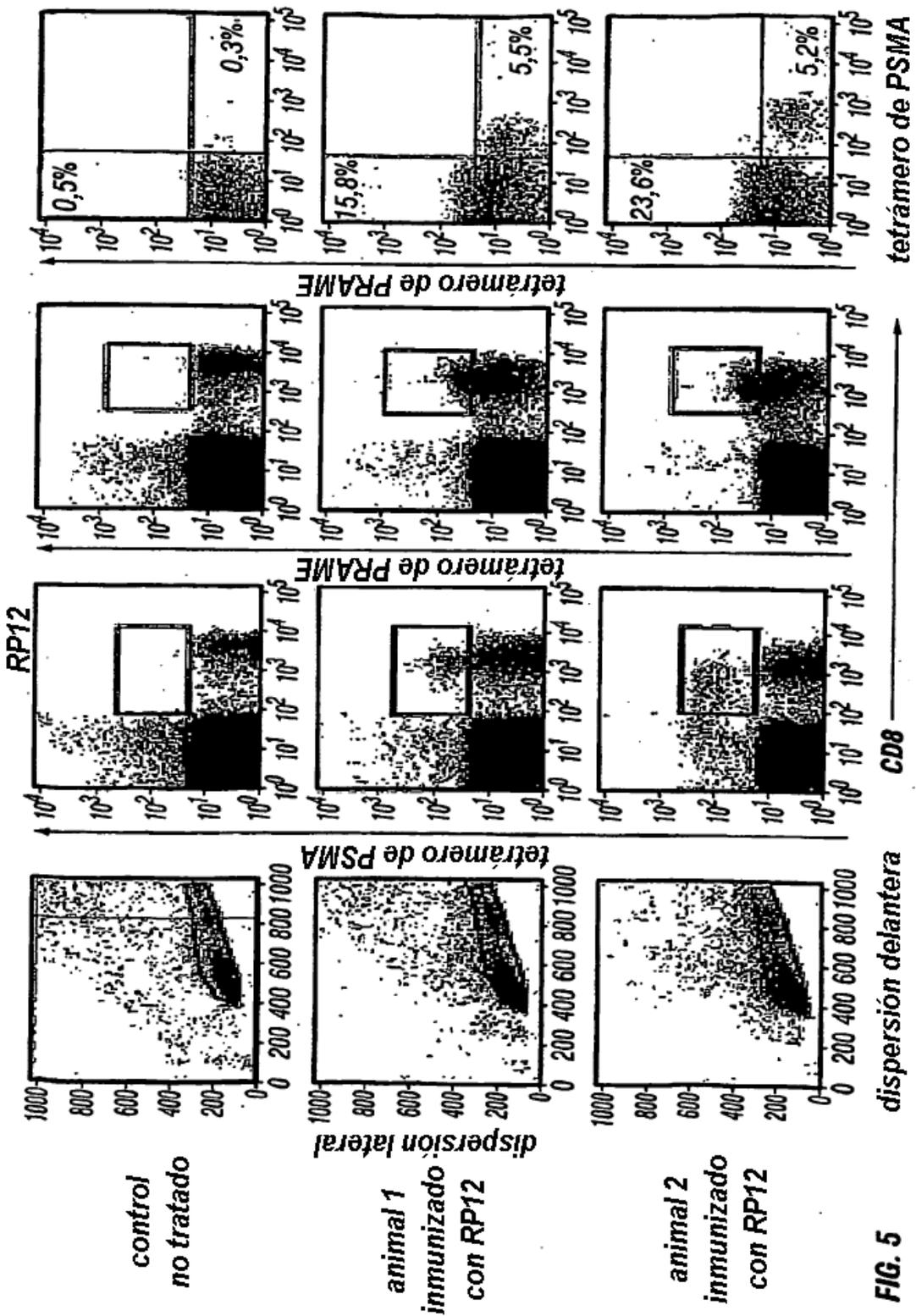
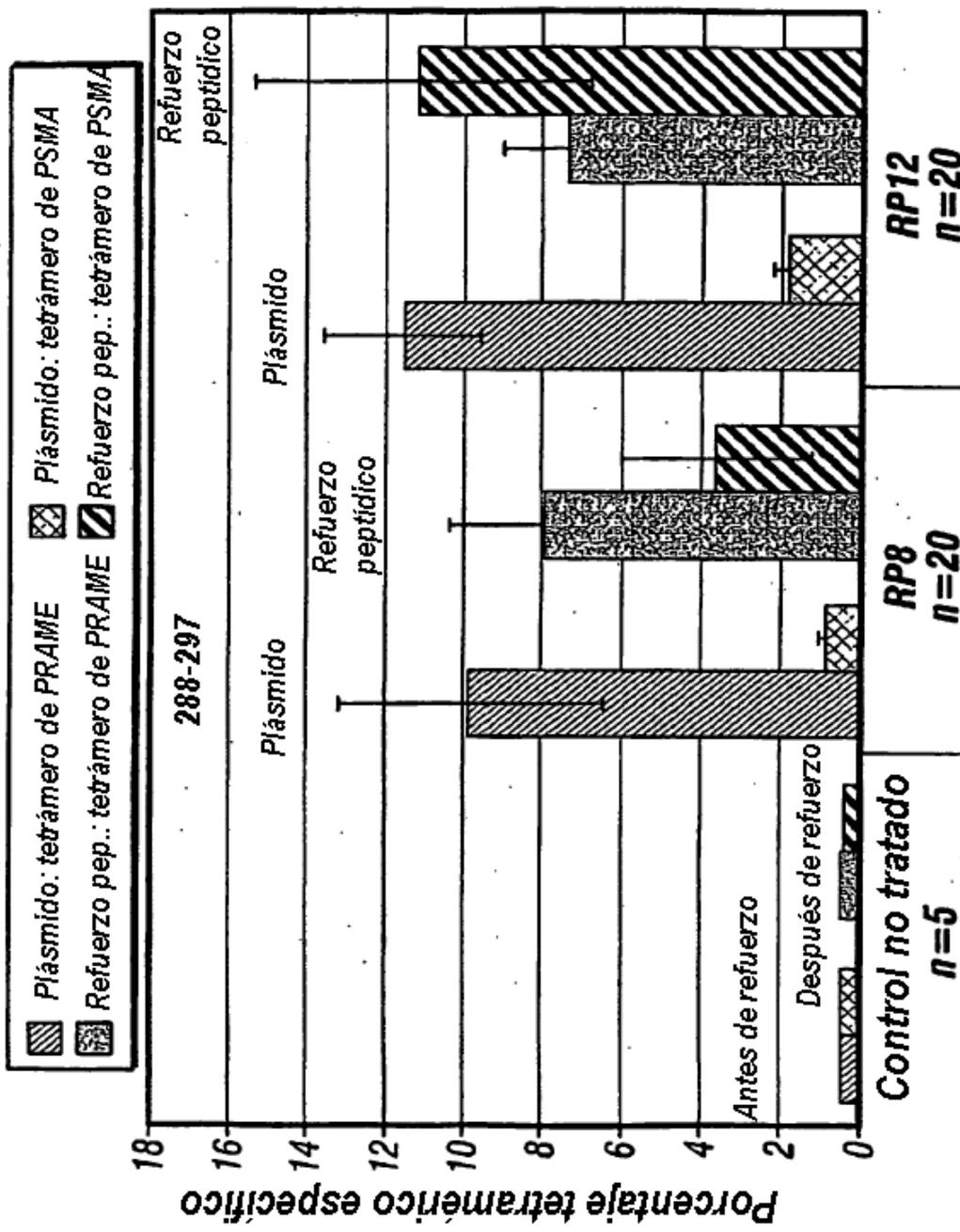


FIG. 5

**Análisis tetramérico de animales inmunizados con plásmido PSMA después de refuerzo con análogo de péptido PSMA 288-297 1297V**



De respuesta dual= 8 De respuesta dual= 16

**FIG. 6**

Análisis tetramérico multicolor PRAME/PSMA después de inmunización con sensibilización con plásmido y refuerzo con péptido

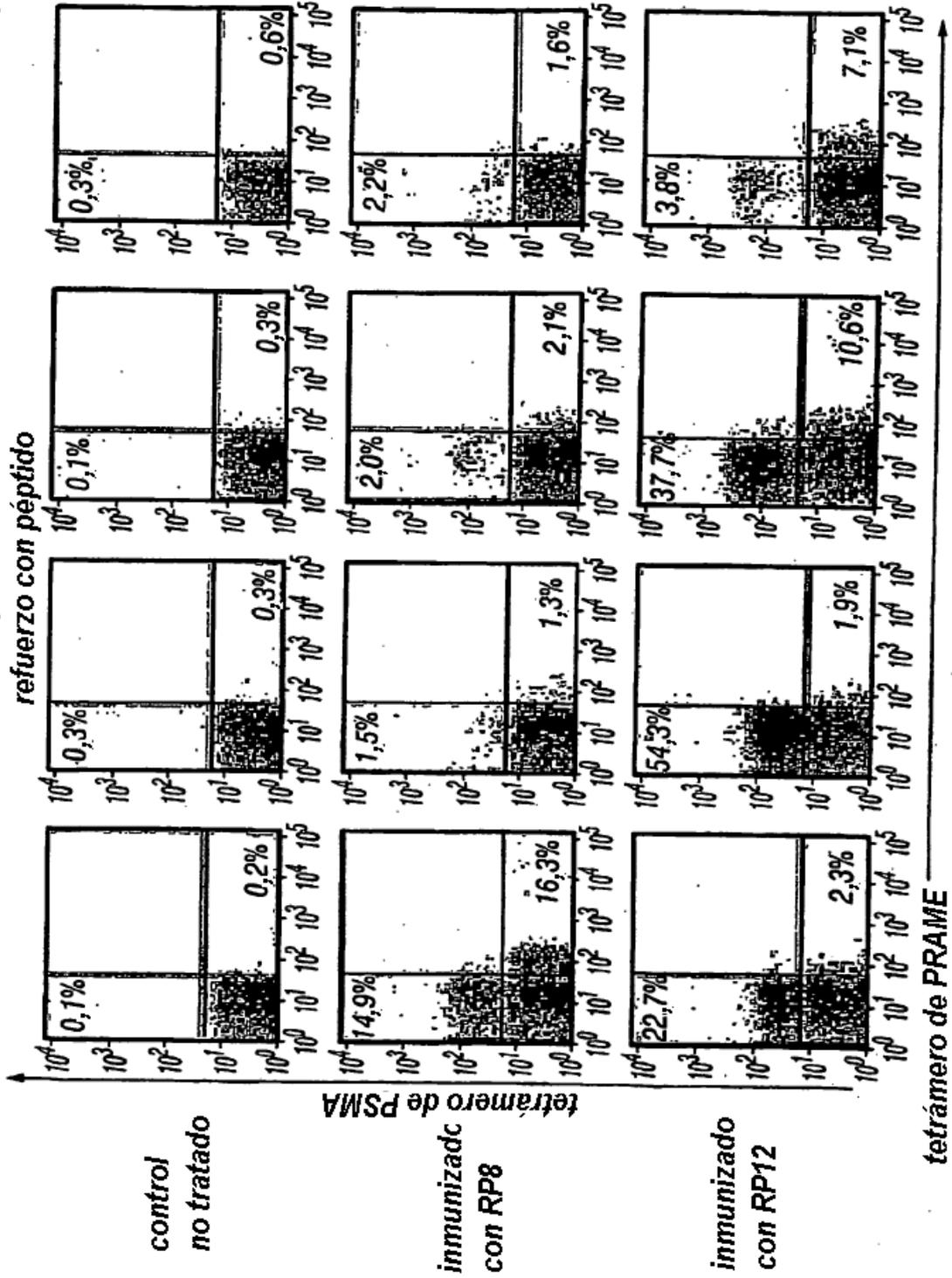


FIG. 6B

Análisis de ELISPOT de IFN- $\gamma$  después de refuerzo con péptidos PSMA y PRAME

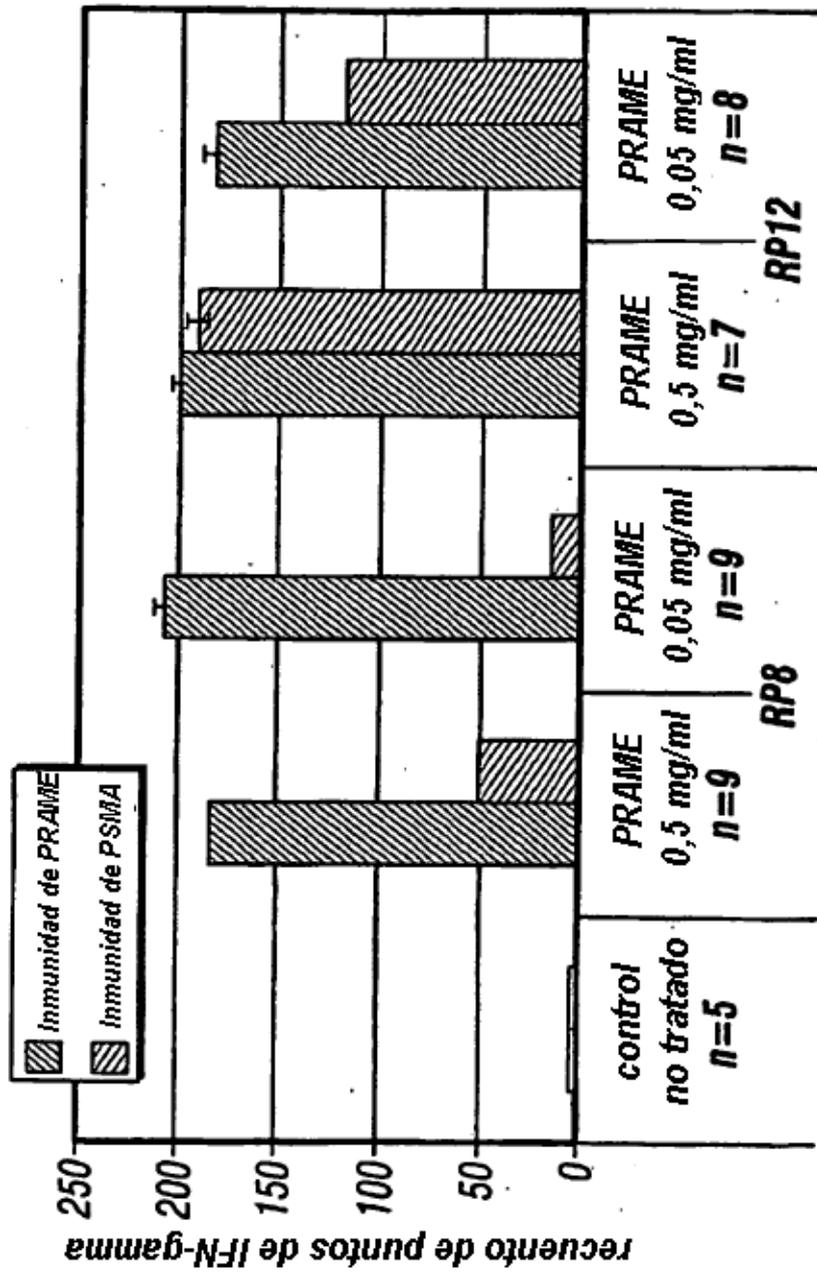


FIG. 7

**MKRPSIKR-SLLQHLIGL-  
ALQSLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRP  
SMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPNKNLLHETDSAVATARRPRW  
LCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGW  
NLPGGGVQVQGNILNLNGAGDPLTPGYANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPI-RK-  
GLPSIPVHPI-LV-GLPSIPVHPI-KRISPEKEEQYIAKR-GLPSIPVHPI-KRPSIK-  
RGLPSIPVHPV**

**FIG. 8**

**MNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSAQLAGAKGVILYSDPADY  
FAPGVKSYPDGWNLPGGGVQVQGNILNLNGAGDPLTPGYANEYAYRRGIAEAVGLPS  
IPVHPIALQSLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLC  
ELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN-KR-SLLQHLIGL-  
SDAAY-SLLQHLIGL-ISPEKEEQYIA-SLLQHLIGL-KRPSIKR-GLPSIPVHPV**

**FIG. 9**