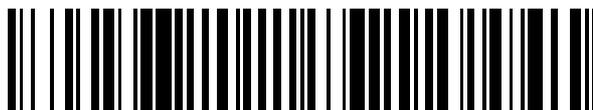


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 366**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2002 E 11004714 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2371854**

54 Título: **Inducción de inmunidad tumoral por variantes de proteína de unión a folato**

30 Prioridad:

09.03.2001 US 274676 P

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

03.10.2014

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)
Office of the General Counsel, 201 West 7th Street**

Austin Texas 78701, US y

THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

**IOANNIDES, CONSTANTIN G. y
PEOPLES, GEORGE E.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 502 366 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

Inducción de inmunidad tumoral por variantes de proteína de unión a folato**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a los campos del cáncer y la inmunología. Específicamente, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para vacunas tumorales dirigidas a antígenos tumorales y se refiere a epítopes específicos sobre estos antígenos que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL). Más específicamente, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para variantes de proteína de unión a folato (FBP).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Se ha informado de que los linfocitos T reactivos frente a tumores median en respuestas terapéuticas contra cánceres humanos (Rosenberg y col., 1988). En ciertos casos, en ensayos de inmunoterapia humana con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) o vacunas tumorales, estas respuestas se correlacionaron tanto con niveles de citotoxicidad *in vitro* contra tumores autólogos (Aebersold y col., 1991) como con expresión de ciertos productos génicos de HLA-A, B, C (Marincola y col., 1992). Estudios recientes (Ioannides y col., 1992) han propuesto que además de oncogenes viralmente codificados y mutados, las proteínas propias expresadas en exceso pueden provocar algún grado de linfocitos T citotóxicos (CTL) reactivos frente a tumores en pacientes con diversos tumores malignos (Ioannides y col., 1992; Ioannides y col., 1993; Brichard y col., 1993; Jerome y col., 1991). Los CTL reactivos frente a tumores autólogos pueden generarse a partir de linfocitos que infiltran ascitis maligna de ovario (Ioannides y col., 1991) y proteínas que se expresan en exceso, tales como HER-2, pueden ser dianas para el reconocimiento de CTL (Ioannides y col., 1992).

Los linfocitos T desempeñan una función importante en la regresión tumoral en la mayoría de los modelos de tumor murino. Los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) que reconocen antígenos del cáncer únicos pueden aislarse de muchos tumores murinos. La transferencia adoptiva de estos TIL, además de interleucina-2, puede mediar en la regresión de metástasis de pulmón e hígado establecidas (Rosenberg y col., 1986). Además, la secreción de IFN- γ por TIL inyectados se correlaciona significativamente con la regresión *in vivo* de tumores murinos sugiriendo la activación de linfocitos T por los antígenos tumorales (Barth y col., 1991). La capacidad conocida de TIL para mediar en la regresión de cáncer metastásico en del 35 al 40 % de los pacientes con melanoma cuando se transfiere adoptivamente a pacientes con melanoma metastásico atestigua la importancia clínica de los antígenos reconocidos (Rosenberg y col., 1988; Rosenberg, 1992).

La fuerte evidencia de que una respuesta inmunitaria al cáncer existe en seres humanos se proporciona por la existencia de linfocitos reactivos frente a tumores dentro de depósitos de melanoma. Estos linfocitos, cuando se aíslan, pueden reconocer antígenos específicos de tumor sobre melanomas autólogos y alógenos en un modo limitado a MHC (Itoh y col., 1986; Muul y col., 1987; Topalian y col., 1989; Darrow y col., 1989; Hom y col., 1991; Kawakami y col., 1992; Hom y col., 1993; O'Neil y col., 1993). Los TIL de pacientes con melanoma metastásico reconocen antígenos compartidos que incluyen antígenos de tejido específicos para linaje de melanocito-melanoma *in vitro* (Kawakami y col., 1993; Anichini y col., 1993). Parece que los linfocitos T anti-melanoma se enriquecen en TIL, probablemente como consecuencia de la expansión y acumulación clónica en el sitio tumoral *in vivo* (Sensi y col., 1993). Se ha demostrado la transducción de linfocitos T con una variedad de genes, tales como citocinas. Se ha mostrado que los linfocitos T expresan productos génicos extraños (Blaese, 1993; Hwu y col., 1993; Culver y col., 1991). El hecho de que los individuos organicen respuestas celulares y humorales contra antígenos asociados a tumores sugiere que la identificación y caracterización de antígenos adicionales de tumor es importante para la inmunoterapia de pacientes con cáncer.

Los receptores de linfocitos T sobre linfocitos T CD8⁺ reconocen un complejo que consiste en un péptido antigénico (9-10 aminoácidos para HLA-A2), β 2 microglobulina y cadena pesada del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (HLA-A, B, C, en seres humanos). Los péptidos generados por digestión de proteínas endógenamente sintetizadas se transportan al retículo endoplásmico, se unen a la cadena pesada del MHC de clase I y β 2 microglobulina, y finalmente se expresan en la superficie celular en el surco de la molécula del MHC de clase I.

La información sobre epítopes de proteínas propias reconocidos en el contexto de moléculas MIMIC de clase I sigue siendo limitada, a pesar de algunos intentos por identificar epítopes que capaces de sensibilización *in vitro* y expansión específica de Ag de CTL humanos. Por ejemplo, se han propuesto epítopes de péptido que son candidatos probables para la unión sobre Ag de MHC de clase I (Falk y col., 1991), y algunos estudios han intentado definir epítopes de péptido que se unen a antígenos de MHC de clase I.

Se ha mostrado que los péptidos sintéticos son una herramienta útil para el mapeo de epítopes de linfocitos T. Sin embargo, la sensibilización *in vivo* e *in vitro* de CTL específicos ha encontrado dificultades (Alexander y col., 1991; Schild y col., 1991; Carbone y col., 1988). Se considera generalmente que la sensibilización de CTL *in vitro* no puede lograrse necesariamente con péptido solo, y en realidad, se cree que se requiere una alta densidad de antígenos

para el cebado de péptidos (Alexander y col., 1991). Incluso en los casos limitados cuando se logró sensibilización específica también se requirieron APC o estimulantes a altas densidades (Alexander y col., 1991).

5 Se han usado péptidos sintéticos cortos tanto como antígenos diana para el mapeo de epítopes como para la inducción de respuestas primarias y secundarias de CTL *in vitro* a Ag virales y parasíticos (Bednarek y col., 1991; Gammon y col., 1992; Schmidt y col., 1992; Kos y Müllbacher, 1992; Hill y col., 1992). Desafortunadamente, estos estudios fracasaron en mostrar la capacidad de análogos de péptidos proto-oncogénicos para estimular CTL humanos *in vitro* para lisar tumores que expresan endógenamente estos antígenos.

10 La identificación de antígenos tumorales (Ag) y de epítopes específicos sobre estos Ag reconocidos por linfocitos T citotóxicos permite el desarrollo de vacunas tumorales (para la revisión de antígenos tumorales véase Rosenberg (2000)). Los Ag tumorales son agonistas débiles parciales para la activación de CTL de baja avidéz (baja afinidad). Los intentos por activar los CTL aumentando la afinidad del péptido por MHC (por modificaciones en los residuos de anclaje) han producido éxitos desiguales incluso con APC poderosas (células dendríticas, DC) y coestimulación de B7 añadido. Algunos de los CTL de reactividad cruzada resultante reconocieron tumores con menor afinidad que los CTL inducidos por Ag natural.

15 La capacidad limitada de los inmunógenos fijados con anclaje para inducir y expandir CTL de alta afinidad eleva la necesidad de enfoques alternativos para la inducción por CTL. Un enfoque a esta cuestión es diseñar inmunógenos que activan CTL "de alta afinidad" del conjunto existente de pacientes que responden al tratamiento. En inmunología de tumores humanos, este enfoque ha sido satisfactorio en algunos casos. Sin embargo, se espera que los CTL de alta afinidad sean más sensibles al silenciamiento por eliminación (por ejemplo, apoptosis) o por anergia (insensibilidad o reactividad disminuida a un antígeno específico).

20 Estos procedimientos se producen como consecuencia de estimulaciones recurrentes con Ag (Ag tumoral) y se amplifican por varias citocinas. El mecanismo general de la muerte celular inducida por activación (AICD) es que estimulaciones repetidas con un Ag en presencia de citocinas tales como IL-2 activan rutas de muerte celular. Esto es debido a que la estimulación con Ag y IL-2 transduce una señal que es demasiado fuerte para inducir proliferación y en su lugar conduce a senescencia prematura. Una ruta de muerte alternativa, la muerte celular pasiva (PCD), se produce cuando se retiran las citocinas que participan en la supervivencia (IL-2, IL-4, IL-7, etc.). Como los Ag tumoral son Ag propios, las células que responden correspondientes deben ser incluso más sensibles a la deleción que las CTL que responden a Ag extraños, debido a que los mecanismos de defensa del cuerpo están programados para evitar la autoinmunidad. Se sabe poco en cuanto a cómo puede inducirse la supervivencia de pacientes que responden a Ag tumoral, y cómo pueden protegerse de AICD o PCD.

25 Están en progreso ensayos preclínicos y clínicos para la utilización de epítopes de péptido específicos para tumor para melanoma (Rivoltini y col., 1999; Parkhurst y col., 1998; Kawakami y col., 1998; Lustgarten y col., 1997; Zengy col., 1997; Reynolds y col., 1998; Nestle y col., 1998; Chakraborty y col., 1998; Rosenberg y col., 1998); cáncer de mama, tal como con MUC1 (Gendler y col., 1998; Xing y col., 1989; Xing y col., 1990; Jerome y col., 1993; Apostolopoulos y col., 1994; Ding y col., 1993; Zhang y col., 1996; Acres y col., 1993; Henderson y col., 1998; Henderson y col., 1996; Samuel y col., 1998; Gong y col., 1997; Apostolopoulos y col., 1995; Pietersz y col., 1998; Lofthouse y col., 1947; Rowse y col., 1998; Gong y col., 1998; Acres y col., 1999; Apostolopoulos y col., 1998; Lees y col., 1999; Xing y col., 1995; Goydos y col., 1996; Reddish y col., 1998; Karanikas y col., 1997), p53 (DeLeo, 1998; McCarty y col., 1998; Hurpin y col., 1998; Gabrilovich y col., 1996) y Her-2/neu (Disis y Cheever, 1998; Ioannides y col., 1993; Fisk y col., 1995; Peoples y col., 1995; Kawashima y col., 1999; Disi y col., 1996); y cáncer de colon (Kantor y col., 1992; Kantor y col., 1992; Tsang y col., 1995; Hodge y col., 1997; Conry y col., 1998; Kass y col., 1999; Zaremba y col., 1997; Nukaya y col., 1999).

30 Recientemente se reconocieron péptidos de proteína de unión a folato (FBP) por linfocitos asociados a tumor (Peoples y col., 1998; Peoples y col., 1999; Kim y col., 1999). La FBP es una glicoproteína asociada a la membrana originalmente encontrada como un Ag definido por mAb en placenta y células trofoblásticas, pero raramente en otros tejidos normales (Retrig y col., 1985; Elwood, 1989; Weitman y col., 1992; Garin-Chesa y col., 1993). De interés, esta proteína se ha encontrado en más del 90 % de carcinomas de ovario y endometrio; en 20-50 % de carcinomas de de mama, colorrectal, de pulmón y de células renales; y en múltiples otros tipos de tumor. Cuando están presentes en tejido canceroso, el nivel de expresión es normalmente superior a 20 veces la expresión de tejido normal y se ha informado que es hasta 80-90 veces en carcinomas de ovario (Li y col., 1996).

35 La patente de EE.UU. nº 5.846.538 se refiere a reactividad inmunitaria a péptidos de proteína HER-2/neu para el tratamiento de tumores malignos.

40 La proteína de unión a folato proporciona una diana ideal para y cumple una necesidad que se sentía desde hace tiempo en la materia para composiciones y procedimientos de utilización de las composiciones dirigidas a inmunidad tumoral.

65

RESUMEN DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 8 o una combinación de las mismas.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar una composición que comprende un antígeno que incluye un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar el antígeno anterior para su uso en un procedimiento para estimular linfocitos T citotóxicos, que comprende la etapa de poner en contacto los linfocitos T citotóxicos con una cantidad de un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, y una combinación de las mismas, en el que la cantidad es eficaz para estimular los linfocitos T citotóxicos. En una realización específica de la presente invención, los linfocitos T citotóxicos se localizan dentro de un ser humano. En otra realización específica, el procedimiento comprende además la etapa de administrar al ser humano un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, y una combinación de las mismas. En otra realización específica de la presente invención, el epítoto se formula para administración parenteral, tópica, o como un inhalante, aerosol o espray.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar el antígeno anterior para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmunitaria, que comprende la etapa de administrar a un ser humano una composición farmacéutica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que comprende un antígeno que comprende un epítoto de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar el antígeno anterior para su uso en un procedimiento de inducción de inmunidad contra un tumor en un individuo, que comprende las etapas de administrar al individuo un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas; y administrar al individuo una vacuna contra el cáncer. En una realización específica de la presente invención, el un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato se administra antes de la administración de la vacuna contra el cáncer. En una realización específica de la presente invención, un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato se administra posterior a la administración de la vacuna contra el cáncer. En otra realización específica de la presente invención, el antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato se administra tanto antes de como después de la administración de la vacuna contra el cáncer. En otra realización específica, la vacuna contra el cáncer comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 268 (E39) y SEC ID N°: 269 (E41).

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar el antígeno anterior para su uso en un procedimiento de inducción de linfocitos T citotóxicos de memoria en un individuo que comprende la etapa de administrar un antígeno que comprende un epítoto de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas. En una realización específica, el individuo es sustancialmente susceptible a reaparición del cáncer.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar el antígeno anterior para su uso en un procedimiento de proporcionar inmunidad contra un tumor que comprende la etapa de administrar un antígeno que comprende una vacuna de epítoto de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar el antígeno anterior para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo para cáncer que comprende las etapas de administrar al individuo una primera vacuna contra el cáncer; y administrar al individuo una segunda vacuna contra el cáncer que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas. En una realización específica, la etapa de administración de la primera vacuna contra el cáncer precede a la etapa de administración de la segunda vacuna contra el cáncer. En otra realización específica, la etapa de administración de la primera vacuna contra el cáncer es posterior a la etapa de administración de la segunda vacuna contra el cáncer.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar el antígeno anterior para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno de células proliferativas en un ser humano, que comprende administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un antígeno que comprende un epítipo de proteína de unión a folato seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el trastorno de células proliferativas es cáncer. En una realización específica adicional, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer renal, melanoma, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer cerebral, sarcomas, o una combinación de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La FIG. 1 demuestra la estabilización de HLA-A2 por variantes de epítipo E39 de FBP.

La FIG. 2A ilustra la inducción de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con múltiples estimulaciones con J65 o E39.

La FIG. 2B ilustra la actividad de CTL en CMSP con múltiples estimulaciones con J65 o E39.

La FIG. 3 ilustra inducción específica de interleucina 2 (IL-2) en CMSP sensibilizando con variantes de E39.

La FIG. 4 ilustra la expansión de CMSP estimuladas con péptido E39 de FBP y sus variantes.

La FIG. 5 demuestra la expansión de CMSP estimuladas con variantes del péptido E39 de FBP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Definiciones

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “un” o “una” pueden significar uno o más. Como se usa en el presente documento en la(s) reivindicación (reivindicaciones), cuando se usan conjuntamente con la palabra “que comprende”, las palabras “un” o “una” pueden significar uno o más de uno. Como se usa en el presente documento, “otro” puede significar al menos un segundo o más.

El término “antígeno”, como se usa en el presente documento, se define como una entidad que provoca una respuesta del sistema inmunitario. El término en el presente documento puede abreviarse “Ag”.

El término “cáncer”, como se usa en el presente documento, se define como un tejido de crecimiento o proliferación no controlado de células, tales como un tumor. En una realización específica, el cáncer es un cáncer epitelial. En realizaciones específicas, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer renal, melanoma, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer cerebral, sarcomas, o una combinación de los mismos. En realizaciones específicas, tales cánceres en mamíferos se producen por anomalías cromosómicas, crecimiento degenerativo y/o trastornos del desarrollo, agentes mitogénicos, radiación ultravioleta (UV), infecciones virales, expresión de tejido inapropiada de un gen, alteraciones en la expresión de un gen, agentes carcinogénicos, o una combinación de los mismos. El término melanoma incluye, pero no se limita a, melanomas, melanomas metastásicos, melanomas derivados de tanto melanocitos como células névicas relacionadas con melanocitos, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanosarcomas, melanoma *in situ*, melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, léntigo maligno melanoma, melanoma lentiginoso acral, melanoma invasivo o síndrome familiar de lunares atípicos familiares y melanoma (FAM-M). Los cánceres anteriormente mencionados pueden tratarse mediante procedimientos descritos en la presente solicitud.

El término “epítipo”, como se usa en el presente documento, se define como un péptido corto derivado de un antígeno de proteína que se une a una molécula de MHC y es reconocido por un linfocito T particular.

El término “variante de proteína de unión a folato”, como se usa en el presente documento, se define como una proteína de unión a folato y péptidos de la misma que son preferentemente reconocidos por linfocitos T colaboradores o linfocitos T citotóxicos y puede derivarse naturalmente, producirse sintéticamente, manipularse genéticamente, o un equivalente funcional de los mismos, por ejemplo, cuando uno o más aminoácidos pueden sustituirse por otro(s) aminoácido(s) o no aminoácido(s) que no afectan sustancialmente la función. En realizaciones específicas, los péptidos son epítopes que contienen alteraciones, modificaciones o cambios en comparación con SEC ID N°: 268 (E39) o SEC ID N°: 269 (E41). En otras realizaciones específicas, las variantes son de SEC ID N°: 2 a SEC ID N°: 8.

El término “respuesta inmunitaria”, como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta inmunitaria celular que incluye provocar la estimulación de linfocitos T, macrófagos y/o linfocitos citolíticos espontáneos.

El término “inmunidad”, como se usa en el presente documento, se define como la capacidad para proporcionar resistencia a un tumor resultante de exposición a un antígeno que es un epítipo de proteína de unión a folato, tal como las variantes de proteína de unión a folato descritas en el presente documento.

5 El término “vacuna”, como se usa en el presente documento, se define como una composición para generar inmunidad a un cáncer. En realizaciones específicas, la vacuna contra el cáncer es un epítipo natural de proteína de unión a folato, tal como E39 (residuos de aminoácidos de FBP 191-199) (SEC ID N°: 268) o E41 (residuos de aminoácidos de FBP 245-253) (SEC ID N°: 269). En otras realizaciones específicas, la vacuna contra el cáncer comprende SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 8, o
10 una combinación de las mismas. En una realización preferida, la administración de la vacuna alterna la señalización mediante el receptor de linfocitos T, reduciendo así la posibilidad de apoptosis.

El término “variante”, como se usa en el presente documento, se define como una forma modificada o alterada de una secuencia natural, tal como el epítipo E39 de proteína de unión a folato (SEC ID N°: 268). La variante puede
15 contener sustitución de al menos un residuo de aminoácido o puede contener una cadena lateral alterada para al menos un residuo de aminoácido.

II. La presente invención

20 A. Realizaciones específicas

La presente invención se refiere a Ag tumoral de proteína de unión a folato modificado para atenuar la señalización mediante receptores de linfocitos T, en comparación con un Ag tumoral de proteína de unión a folato natural, particularmente para reducir la posibilidad de apoptosis que resulta tras la exposición repetida a antígenos fuertes.
25 Así, las variantes de epítopos de proteína de unión a folato tales como E39 (SEC ID N°: 268) y E41 (SEC ID N°: 269), que son antígenos “fuertes”, se modifican para actuar de antígeno “débil”. Así, la presente invención utiliza composiciones y procedimientos para atenuar la señalización mediante los receptores de linfocitos T.

La invención funciona como (1) prevacuna de preestimulación, que va a administrarse antes del Ag tumoral; (2) como post-vacuna que va a administrarse después del Ag tumoral; y/o (3) en ciertos individuos funcionará como una vacuna de sensibilización. Las situaciones (1) y (2) están más relacionadas con una función protectora para SEC ID N°: 5 (J65) y sus análogos para CTL reactivos frente a tumores. La situación (3) puede encontrarse en ciertos individuos en los que las mutaciones en el bolsillo de unión a Ag de histocompatibilidad pueden transformar un atenuador en un inmunógeno fuerte.
30

La invención permite protección antes y después de la vacunación de o bien precursores (sustituto) o bien efectores activados. En realizaciones específicas, la administración de las variantes de proteína de unión a folato proporciona inducción dirigida de CTL de memoria.
35

Las variantes descritas en el presente documento, en una realización particular SEC ID N°: 5, pretenden atenuar la señalización a estimulación recurrente, induciendo así la protección de precursores de CTL a partir de linfocitos T activados a partir de la apoptosis, permitiendo así que se expanda la respuesta inmunitaria, y, en realizaciones preferidas, tienen implicaciones importantes en la inducción de CTL de memoria.
40

Es muy conocido que los dos brazos principales del sistema inmunitario son: (1) inmunidad mediada por células con linfocitos T inmunitarios; y (2) inmunidad humoral con anticuerpos. Además, el sistema inmunitario normalmente funciona reconociendo y destruyendo cualquier célula extraña o aberrante en el cuerpo. Como la FBP se expresa por algunas células normales, se espera tolerancia y/o anergia.
45

El desarrollo de terapias moleculares para el cáncer se ha basado históricamente en el reconocimiento específico de Ag por efectores inmunitarios celulares. La presente invención desvela novedosas estrategias que tienen como objetivo la identificación de dianas de péptido para CTL, y la generación de la inmunidad de linfocitos T contra epítopos específicos (para una revisión de inmunidad específica de linfocitos T véase, por ejemplo, Ioannides y col., 1992; Houbiers y col., 1993).
50

Para lograr esto, la presente invención proporciona péptidos novedosos naturalmente y sintéticamente derivados que se unen a cadenas pesadas de clase I del antígeno leucocitario humano (HLA). Se han definido criterios apropiados para la selección de epítopos *in vitro*, y también se han producido péptidos sintéticos basados en epítopos inmunogénicos de FBP.
55

Aunque los anclajes dominantes para la unión de péptido a HLA-A2 son Leu (P2) y Val (P9), se identificaron varios residuos con carga y cadenas laterales similares, tales como Ile y/o Met, en epítopos de CTL de proteínas virales (Falk y col., 1991; Bednarek y col., 1991).
60

65 B. Realizaciones generales

1. Epítopes de CTL

Los epítopes de CTL informados hasta la fecha se derivan principalmente de proteínas extrañas (virales) con poca o ninguna homología con proteínas propias. Con respecto a respuestas de CTL a proteínas propias, se espera que los linfocitos T que expresan TCR con alta afinidad por complejos de péptido propio-clase I de MHC se eliminen en el timo durante el desarrollo. Los péptidos propios eluidos de moléculas de HLA-A2.1 de diversas líneas celulares muestran residuos en P3-P5 y P7-P8 que son diferentes de las secuencias de epítopes virales reconocidos por CTL humanos. Como es probable que estos residuos se pongan en contacto e interaccionen con TCR, pueden reflejar péptidos para los que los linfocitos T autólogos ya son tolerantes/anérgicos.

Para los epítopes propios que reconocen linfocitos T que van a eliminarse o anergizarse existe una condición previa de que el complejo de péptido-MHC sea suficientemente estable para acoplar un número suficiente de TCR, o al menos más estable, que otros complejos de péptido HLA-A2, en lo que un péptido puede desplazarse fácilmente por otros péptidos. Por consiguiente, esto sugeriría que para proteínas propias con extensión a FBP, será menos probable que las que pueden unirse a TCR con alta afinidad durante el desarrollo sean reconocidas después cuando se expresan sobre una diana distinta de tumor que los péptidos que se unen a HLA-A2 con baja afinidad, que bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, alta concentración de proteína) pueden ocupar un número mayor de moléculas de HLA-A2. Para péptidos de baja afinidad, la modificación de los anclajes que produce la estabilización de la interacción de péptido-HLA-A2 que reemplaza residuos de anclaje débil con dominantes (por ejemplo, (P9) M=>V, debe facilitar la reactividad de CTL con dianas que expresan tales antígenos, debido a que TCR interacciona principalmente con la secuencia P4-P8.

La progresión y metástasis tumoral frecuentemente están asociadas a expresión en exceso de proteínas celulares específicas. Epítopes de proteínas expresadas en exceso no mutadas pueden ser dianas de una respuesta inmunitaria celular específica contra tumor mediado por linfocitos T. Además, cuando están presentes epítopes de linfocitos T, la distinción entre inmunidad/autoinmunidad tumoral e insensibilidad puede afirmarse sobre la concentración de proteína como un factor limitante de administración de epítopes.

2. Secuencias centrales epitópicas

La presente invención también se refiere a composiciones de proteínas o péptidos, libres de células totales y otros péptidos, que comprenden una proteína o péptido purificado que incorpora un epítope que es inmunológicamente reconocido por un CTL.

Como se usa en el presente documento, el término "incorporar un epítope(s) que es inmunológicamente reconocido por un CTL" pretende referirse a un antígeno de péptido o proteína que incluye una estructura primaria, secundaria o terciaria similar a un epítope localizado dentro de un polipéptido de FBP. El nivel de similitud será generalmente a tal grado que la misma población de CTL también se unirá a, reaccionará con, o reconocerá de otro modo, el péptido o antígeno de proteína reactivo de forma cruzada.

La identificación de epítopes inmunodominantes estimulantes de CTL y/o sus equivalentes funcionales, adecuados para su uso en vacunas, es una materia relativamente directa. Por ejemplo, pueden emplearse los procedimientos de Hopp, como se enseña en la patente de EE.UU. 4.554.101, que enseña la identificación y preparación de epítopes de secuencias de aminoácidos basándose en hidrofilia. Los procedimientos descritos en varios otros documentos y programas de software basados en ellos también pueden usarse para identificar secuencias centrales epitópicas (véase, por ejemplo, Jameson y Wolf, 1988; Wolf y col., 1988; patente de EE.UU. número 4.554.101). La secuencia de aminoácidos de estas "secuencias centrales epitópicas" puede entonces incorporarse fácilmente en péptidos, tanto mediante la aplicación de síntesis de péptidos como tecnología recombinante.

Péptidos preferidos para su uso según la presente invención serán generalmente del orden de 8 a 20 aminoácidos de longitud, y más preferentemente aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos de longitud. Se propone que los péptidos estimulantes de CTL antigénicos más cortos proporcionarán ventajas en ciertas circunstancias, por ejemplo, en la preparación de vacunas o en ensayos de detección inmunológica. Ventajas a modo de ejemplo incluyen la facilidad de preparación y purificación, el coste relativamente bajo y la reproducibilidad mejorada de la producción, y biodistribución ventajosa.

Se propone que ventajas particulares de la presente invención puedan realizarse mediante la preparación de péptidos sintéticos que incluyen secuencias centrales epitópicas/inmunogénicas modificadas y/o extendidas que producen un péptido epitópico "universal" dirigidas a secuencias de FBP. Estas secuencias centrales epitópicas se identifican en el presente documento en aspectos particulares como regiones hidrófilas del antígeno del polipéptido de FBP. Se propone que estas regiones representen aquellas que son las que más probablemente promueven la estimulación de linfocitos T o B, y, por tanto, provocan la producción de anticuerpos específicos.

Una secuencia central epitópica, como se usa en el presente documento, es un estiramiento relativamente corto de aminoácidos que es "complementario a" y, por tanto, se unirá, a receptores sobre CTL. Se entenderá que en el contexto de la presente divulgación el término "complementario" se refiere a aminoácidos o péptidos que presentan

una fuerza de atracción hacia el otro.

En general, no se cree que el tamaño del antígeno de polipéptido sea particularmente crucial, en tanto que sea al menos suficientemente largo para llevar la secuencia o secuencias centrales identificadas. La secuencia central útil más pequeña anticipada por la presente divulgación sería generalmente del orden de aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, siendo más preferidas secuencias del orden de 9 ó 10. Así, este tamaño se corresponderá generalmente con los antígenos de péptido más pequeños preparados según la invención. Sin embargo, el tamaño del antígeno puede ser mayor si se desea, mientras que contenga una secuencia central epitópica básica.

Un experto reconoce que están disponibles numerosos programas informáticos para su uso en predecir porciones antigénicas de proteínas (véase, por ejemplo, Jameson & Wolf, 1988; Wolf y col., 1988). Los programas de análisis de secuencias de péptidos computerizadas (por ejemplo, software DNASTar, DNASTar, Inc., Madison, Wisc.) también pueden ser útiles en diseñar péptidos sintéticos según la presente divulgación.

Las síntesis de secuencias epitópicas, o péptidos que incluyen un epítipo antigénico dentro de su secuencia, se consiguen fácilmente usando técnicas sintéticas convencionales tales como el procedimiento en fase sólida (por ejemplo, mediante el uso de sintetizador de péptidos comercialmente disponible tal como un sintetizador de péptidos modelo 430A de Applied Biosystems). Los antígenos de péptido sintetizados de este modo pueden entonces separarse en alícuotas en cantidades predeterminadas y guardarse de maneras convencionales, tales como en disoluciones acuosas o, incluso más preferentemente, en un estado en polvo o liofilizado pendiente de uso.

En general, debido a la estabilidad relativa de los péptidos, pueden guardarse fácilmente en disoluciones acuosas durante periodos de tiempo bastantes largos si se desea, por ejemplo, hasta seis meses o más, en prácticamente cualquier disolución acuosa sin degradación o pérdida apreciable de la actividad antigénica. Sin embargo, si se contempla almacenamiento acuoso prolongado generalmente se deseará incluir agentes que incluyen tampones tales como tampones Tris o fosfato para mantener un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. Además, puede desearse incluir agentes que inhibirán el crecimiento microbiano, tales como azida de sodio o Merthiolate. Para el almacenamiento prolongado de un estado acuoso se deseará guardar las disoluciones a 4 °C, o más preferentemente, congelarse. Por supuesto, si los péptidos se almacenan en un estado liofilizado o en polvo, pueden almacenarse prácticamente indefinidamente, por ejemplo, en alícuotas medidas que pueden rehidratarse con una cantidad predeterminada de agua (preferentemente destilada) o tampón antes de uso.

3. Linfocitos T

Los linfocitos T reconocen antígeno en forma de fragmentos de péptido que se unen a moléculas de clase I y clase II del sitio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es una designación genérica que pretende englobar los sistemas de antígeno de histocompatibilidad descritos en diferentes especies que incluyen los antígenos leucocitarios humanos (HLA). El receptor de linfocitos T para antígeno (TCR) es un complejo de al menos 8 cadenas de polipéptidos ("Basic and Clinical Immunology" (1994) Stites, Terr y Parslow (eds) Appleton y Lange, Nenmack Conn.) Dos de estas cadenas (las cadenas alfa y beta) forman un dímero ligado a disulfuro que reconoce péptidos antigénicos unidos a moléculas de MHC y, por tanto, es la estructura de unión a ligando real dentro del TCR. Las cadenas alfa y beta del TCR son similares en muchos aspectos a las proteínas de inmunoglobulina. Las regiones del extremo amino de las cadenas alfa y beta son altamente polimórficas, de manera que dentro de la población de linfocitos T entera hay un gran número de dímeros alfa/beta de TCR diferentes, cada uno de los cuales puede reconocer o unirse a una combinación particular de péptido antigénico y MHC.

En general, se considera que las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ funcionan como colaboradores/inductores mediante la liberación de linfocinas cuando se estimulan por un antígeno específico; sin embargo, un subconjunto de células CD4⁺ puede actuar de linfocitos T citotóxicos (CTL). Similarmente, se considera que los linfocitos T CD8⁺ funcionan lisando directamente dianas antigénicas; sin embargo, bajo una variedad de circunstancias pueden secretar linfocinas para proporcionar función colaboradora o de DTH. A pesar del potencial de solapar función, los marcadores de CD4 y CD8 fenotípicos están ligados al reconocimiento de péptidos unidos a los antígenos de MHC de clase II o clase I. El reconocimiento de antígeno en el contexto de MHC de clase II o clase I requiere que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ respondan a diferentes antígenos o el mismo antígeno presentado bajo diferentes circunstancias. La unión de péptidos inmunogénicos a los antígenos del MHC de clase II se produce lo más comúnmente para antígenos ingeridos por células presentadoras de antígeno. Por tanto, los linfocitos T CD4⁺ generalmente reconocen antígenos que han sido externos a las células tumorales. Por el contrario, bajo circunstancias normales, la unión de péptidos al MHC de clase I se produce solo para proteínas presentes en el citosol y sintetizadas por la propia diana, se excluyen proteínas en el entorno externo. Una excepción a esto es la unión de péptidos exógenos con un motivo de unión de clase I preciso que están presentes fuera de la célula en alta concentración. Así, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tienen funciones ampliamente diferentes y tienden a reconocer diferentes antígenos como una reflexión de dónde residen normalmente los antígenos.

Como se ha desvelado dentro de la presente invención, el producto de proteína expresado por FBP es reconocido por linfocitos T. Tal producto de expresión de proteína "se da la vuelta" dentro de las células, es decir, experimenta un ciclo en el que funciona una proteína sintetizada y luego se degrada eventualmente y se sustituye por una

molécula recientemente sintetizada. Durante el ciclo de vida de las proteínas, los fragmentos de péptidos de la proteína se unen a antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Mediante la expresión de un péptido unido a antígeno de MHC sobre la superficie celular y reconocimiento por linfocitos T del huésped de la combinación de péptido más antígeno de MHC propio, una célula maligna será inmunogénica para linfocitos T. La exquisita especificidad del receptor de linfocitos T permite que linfocitos T individuales discriminen entre fragmentos de proteínas que se diferencian en un único residuo de aminoácido.

Durante la respuesta inmunitaria a un péptido, los linfocitos T que expresan un receptor de linfocito T con alta afinidad de unión al complejo de péptido-MHC se unirán al complejo de péptido-MHC y así se activarán e inducirá que proliferen. En el primer encuentro con un péptido, números pequeños de linfocitos T inmunitarios secretarán linfocinas, proliferarán y se diferenciarán en linfocitos T efectores y de memoria. Los posteriores encuentros con el mismo antígeno por el linfocito T de memoria conducirán a una respuesta inmunitaria más rápida y más intensa.

La proteína de unión a folato intacta o péptidos de las mismas que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos pueden usarse dentro de la presente invención. Los péptidos pueden derivarse naturalmente o producirse basándose en una secuencia identificada. Los péptidos para respuestas de linfocitos T CD8⁺ (provocados por péptidos presentados por moléculas de MHC de clase I de proteína de unión a folato) tienen generalmente aproximadamente 8-10 aminoácidos de longitud. Los péptidos para respuestas de linfocitos T CD8⁺ varían según cada molécula de MHC de clase I del individuo. Ejemplos de péptidos adecuados dentro de la presente invención para respuestas de linfocitos T CD8⁺ incluyen péptidos que comprenden o que consiste en / SEC ID N°: 2 a SEC ID N°: 8.

Será evidente para aquellos expertos habituales en la materia que otros péptidos pueden producirse para su uso dentro de la presente invención, tanto para las moléculas de MHC de clase I, además de para las moléculas de clase II. Son muy conocidas una variedad de técnicas para aislar o construir péptidos. Péptidos adecuados se identifican fácilmente basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento. Péptidos adecuados adicionales incluyen aquellos que son de longitud más larga. Aquellos péptidos pueden extenderse (por ejemplo, mediante la adición de uno o más residuos de aminoácidos) y/o truncarse (por ejemplo, por la delección de uno o más residuos de aminoácidos del extremo carboxilo). Alternativamente, péptidos adecuados pueden ser variaciones de otros péptidos preferidos desvelados en el presente documento. Aunque esta variación de péptidos particular puede producir un péptido con el mismo número de aminoácidos totales (tal como nueve), una variación de péptidos de un péptido preferido no necesita ser de longitud idéntica. Variaciones en secuencia de aminoácidos que dan péptidos que tienen sustancialmente la misma actividad biológica deseada están dentro del alcance de la presente invención.

La inmunización de un individuo con un péptido FBP (es decir, como una vacuna) puede inducir expansión continuada en el número de linfocitos T necesarios para el ataque terapéutico contra un tumor en el que FBP está asociado. Normalmente, aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal se administrarán por la vía intradérmica, subcutánea o intravenosa. Una dosificación preferida es aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, siendo particularmente preferido aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 200 µg/kg. Será evidente para aquellos expertos en la materia que el número y frecuencia de administraciones será dependiente de la respuesta del paciente. Puede desearse administrar el péptido FBP repetitivamente. Será evidente para aquellos expertos en esta materia que puede administrarse más de un péptido FBP, tanto simultáneamente como secuencialmente. Por ejemplo, una combinación de aproximadamente 8-15 péptidos puede usarse para inmunización. Péptidos preferidos para inmunización son aquellos que incluyen toda o una porción de al menos un aminoácido de FBP de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 68, o variantes de las mismas.

Además del péptido FBP (que funciona como antígeno), puede desearse incluir otros componentes en la vacuna, tales como un vehículo para la administración de antígeno y sustancias inmunoestimulantes diseñadas para potenciar la inmunogenicidad de la proteína. Ejemplos de vehículos para la administración de antígeno incluyen sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, vehículos de aceite biodegradables, emulsiones de aceite en agua, microcápsulas biodegradables y liposomas. Ejemplos de sustancias inmunoestimulantes (adyuvantes) incluyen N-acetilmuramilo-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), lipopolisacáridos (LPS), glucano, IL-12, GM-CSF, interferón gamma y IL-15. Será evidente para aquellos expertos en esta materia que un péptido FBP puede prepararse sintéticamente o que una porción de la proteína (naturalmente derivada o sintética) puede usarse. Cuando un péptido se usa sin secuencias adicionales puede desearse acoplar el hapteno de péptido a una sustancia portadora, tal como hemocianina de lapa californiana.

Los procedimientos y composiciones de la presente invención son particularmente muy adecuados para inducir una respuesta inmunitaria en un paciente que ha desarrollado resistencia a tratamientos contra el cáncer convencionales o que tiene una alta probabilidad de desarrollar una reaparición tras el tratamiento. Un experto reconoce que las células cancerosas pueden evadir el sistema inmunitario o evadir una respuesta inmunitaria eficaz debido a que parecen propias, anergizan activamente el sistema inmunitario a cualquier antígeno que pueda diferenciarse posiblemente entre propio y tumoral, y pueden crear un entorno inmunosupresor secretando factores inmunosupresores y/o expresando factores que pueden inducir apoptosis de un antígeno ofensivo de células asesinas específicas para tumor.

Un experto conoce múltiples revisiones referentes a vacunas contra el cáncer y la generación de respuestas inmunitarias celulares a péptidos tumorales antigénicos (Pietersz y col., 2000; Pardoll, 2000; Rosenberg, 2000; Dalgleish, 2000).

5 Un experto reconoce que el antígeno puede producirse en grandes cantidades por tecnología recombinante, bien como moléculas solubles en sistemas eucariotas o bien como proteínas de fusión en sistemas bacterianos. En una realización específica, los péptidos sintéticos se preparan a partir del antígeno tumoral. Además, los anticuerpos monoclonales para los antígenos tumorales son útiles en su identificación y purificación.

10 En un enfoque de péptido para inmunoterapia tumoral, los péptidos (tales como aproximadamente 8-9-meros) se presentan por moléculas de clase I de MHC, conduciendo a la generación de respuestas celulares mediadas por CD8⁺ que comprenden CTL y secreción de citocinas, principalmente en forma de IFN- γ y TNF- α .

15 Un experto reconoce que la célula dendrítica es importante en generar CTL CD8⁺ tras la presentación de clase I. Esche y col. (1999) demostraron técnicas por las cuales células dendríticas se obtienen de pacientes, se aíslan, se expanden *in vitro*, se exponen a los péptidos y se reintroducen en el paciente. Otros utilizan células dendríticas similarmente tratadas para la generación de linfocitos T específicamente activados *in vitro* antes de la transferencia.

20 Una etapa inicial crucial en la generación de linfocitos T CD8⁺ es la captación y presentación de péptidos por moléculas de MHC por células presentadoras de antígeno. Las proteínas de clase I de MHC consisten en tres subunidades, todas las cuales son importantes para la formación de un complejo estable. La cristalografía de rayos X de las moléculas de clase I de MHC ha demostrado que la interacción de péptidos con el surco de clase I de MHC se determina por la secuencia de péptidos, con aminoácidos discretos que interaccionan con bolsillos en el surco de MHC (que tienen una separación fija entre sí) y también tienen especificidad anclando cadenas laterales de aminoácidos. Aunque hay excepciones, los extremos amino y carboxi de los péptidos se anclan en cualquier extremo del surco, frecuentemente en las posiciones 2 ó 3, 5 ó 7 (Apostolopoulos y col., 1997a; Apostolopoulos y col., 1997b). Los péptidos también interaccionan con el receptor de linfocitos T, aunque solo se expone una pequeña cantidad del péptido (Apostolopoulos y col., 1998).

30 Dado que se han identificado múltiples antígenos tumorales de péptido, tales como proteína de unión a folato, además de la caracterización de epítopes de linfocitos T, en una realización específica de la presente invención los antígenos peptídicos se generan sintéticamente para inmunización. La inmunogenicidad de pequeños péptidos puede mejorarse aumentando el tamaño del péptido, uniéndose a vehículos y también usando adyuvantes para activar macrófagos y otros factores del sistema inmunitario. Un experto es consciente de las citocinas recombinantes que se usan para aumentar la inmunogenicidad de un péptido sintético (Tao y Levy, 1993) y además de que las citocinas también pueden fusionarse directamente con péptidos (Nakao y col., 1994; Disis y col., 1996; Chen y col., 1994).

40 En realizaciones específicas de la presente invención, mezclas de péptidos separados se administran como una vacuna. Alternativamente, pueden incorporarse múltiples epítopes en la misma molécula por tecnología recombinante muy conocida en la técnica (Mateo y col., 1999; Astori y Krachenbuhl, 1996). En otra realización se usa una biblioteca de péptidos combinatoria para aumentar los péptidos de unión utilizando diferentes aminoácidos en al menos una localización de anclaje.

45 En otra realización de la presente invención, los aminoácidos naturales de un péptido se sustituyen con D-aminoácidos no naturales; alternativamente, los residuos de péptido se ensamblan en orden inverso, que convierte los péptidos en resistentes a proteasas (Briand y col., 1997; Herve y col., 1997; Bartnes y col., 1997; Guichard y col., 1996). En otra realización, aminoácidos modificados no naturales se incorporan en un péptido, tal como ácido α -aminoisobutírico o N-metilsarina.

50 Un experto reconoce que la fuerza de unión del 8- o 9-mero al complejo de MHC y el posterior reconocimiento por el receptor de linfocitos T determina la inmunogenicidad de péptidos de CTL. Van Der Burg y col. (1993) determinaron que cuanto más tiempo siga unido el péptido al complejo de MHC, mejor será la posibilidad de inducir una respuesta de linfocitos T. Un experto también reconoce que hay procedimientos para introducir péptidos externos directamente en el citoplasma de una célula para permitir la generación de respuestas inmunitarias celulares limitadas a la clase I. Un ejemplo incluye toxinas microbianas, que pueden llevar péptidos en su citoplasma para la administración debido a que entran en las células por endocitosis mediada por receptor y así depositan toxinas celulares en el citoplasma. Ejemplos específicos incluyen la toxina Shiga (Lee y col., 1998), toxina del carbunco (Goletz y col., 1997), toxina diftérica (Stenmark y col., 1991), exotoxina de *Pseudomonas* (Donnelly y col., 1993) y toxina de *Bordetella pertussis* (Fayolle y col., 1996).

60 En realizaciones alternativas, los péptidos entran en células mediante la fusión de membranas y son beneficiosos para administrar tumor u otros péptidos a un citoplasma de célula, que incluye *Antennapedia* (Derossi y col., 1994; Derossi y col., 1996; Schutze-Redelmeier y col., 1996), proteína Tat (Kim y col., 1997) y péptido de fusión del virus del sarampión (Partidos y col., 1997).

65

En otras realizaciones, los péptidos se introducen en un citoplasma mediante lipopéptidos, que comprenden tanto un lípido como un péptido, por inserción directa en la membrana celular lipófila (BenMohamed y col., 1997; Oberty col., 1998; Deprez y col., 1996; Beekman y col., 1997). En realizaciones alternativas, los péptidos se administran en liposomas (por ejemplos, véase Nakanishi y col., 1997; Noguchi y col., 1991; Fukasawa y col., 1998; Guany col., 1998), por lo que la inmunogenicidad depende del tamaño, carga, composición de lípidos del propio liposoma y si el antígeno está presente o no sobre la superficie del liposoma o dentro de su interior.

Un experto también reconoce que los complejos inmunoestimulantes (ISCOM), que comprenden Quill A (una mezcla de saponinas), colesterol, fosfolípido y proteínas son útiles para administrar antígenos naturalmente hidrófobos o antígenos hechos hidrófobos mediante la adición de colas de ácido mirístico o palmítico (por ejemplos, véase Hsu y col., 1996; Sjolandery col., 1997; Villacres-Eriksson, 1995; Tarpey y col., 1996; Rimmelzwaan y col., 1997). Los ISCOM facilitan la penetración en células por fusión con sus membranas, por endocitosis, o por fagocitosis.

Los antígenos también pueden dirigirse a compartimentos subcelulares particulares mediante la incorporación de señales de clasificación al antígeno por tecnología recombinante, que incluye LAMP-I de clase II (Rowell y col., 1995; Wuy col., 1995), péptido que elige RE como diana (Minev y col., 1994); CLIP (Malcherik y col., 1998) y proteínas de choque térmico (Udono y Srivastava, 1993; Heike y col., 1996; Zhu y col., 1996; Suzue y col., 1997; Ciupitu y col., 1998).

Un experto reconoce que la presente invención proporciona composiciones terapéuticas contra el cáncer que comprenden una variedad de péptidos designados para respuestas de linfocitos T CD8⁺ que comprenden SEC ID N°: 2 a SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas. Un experto también reconoce que la presente invención proporciona composiciones terapéuticas contra el cáncer que comprenden una variedad de péptidos designados para respuestas de linfocitos T CD8⁺ que consisten esencialmente en SEC ID N°: 2 a SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas.

Un experto reconoce que referencias tales como Abrams y Schlom (2000) resumen los presentes puntos de vista sobre la modificación racional de Ag. Se describen dos tipos de péptidos: (1) péptidos agonistas que regulan por incremento respuestas específicas para Ag; (2) péptidos antagonistas/agonistas parciales que regulan por disminución las mismas respuestas. Sin embargo, es un objetivo de la presente invención proporcionar terapia que estimula respuestas inmunitarias específicas para Ag mientras que al mismo tiempo no se provoca la muerte celular inducida por activación o muerte por abandono.

Un experto reconoce que las secuencias que codifican epitopes de proteína de unión a folato para la inducción de inmunidad tumoral pueden obtenerse de bases de datos tales como la base de datos GenBank del Centro Nacional para Información Biotecnológica o bases de datos comercialmente disponibles, tales como la de Celera Genomics, Inc. (Rockville, MD). Ejemplos de secuencias de proteína de unión a folato que pueden comprender un epítipo o que pueden alterarse para comprender un epítipo incluyen las siguientes, indicadas por los números de acceso de GenBank: P14207; P15328; P13255; NP_000793; AAB05827; AAG36877; S42627; S00112; BFBO; S62670; S62669; A55968; A45753; A33417; B40969; A40969; NP_057943; NP_057942; NP_057941; NP_057937; NP_057936; NP_037439; NP_032061; NP_032060; NP_000795; NP_000794; AAF66225; BAA37125; P02752; Q05685; P35846; P02702; AAD53001; AAD33741; AAD33740; AAD19354; AAD19353; AAC98303; AAB81938; AAB81937; AAB49703; AAB35932; 1011184A; 0908212A; CAA44610; CAA83553; AAA74896; AAA49056; AAA37599; AAA37598; AAA37597; AAA37594; AAA37596; AAA37595; AAA35824; AAA35823; AAA35822; AAA35821; AAA18382; y AAA17370.

Un experto también reconoce que los epítipes de secuencias de ácidos nucleicos de la proteína de unión a folato están codificados por, o se alteran para codificar una variante de, por ejemplo, uno de los siguientes: U02715; BE518506; BG058247; BG017460; NM_000802; U20391; NM_016731; NM_016730; NM_016729; NM_016725; NM_016724; NM_013307; NM_008035; NM_008034; BF153292; BF114518; BE940806; BE858996; AF219906; AF219905; AF219904; BE687177; BE636622; BE627230; BE506561; BE505048; BE496754; BB114010; BB109527; BB107219; BE206324; BE448392; BE207596; BE206635; BE240998; BE228221; BE225416; BE225404; BB214040; BE199619; BE199597; BE198610; BE198571; BE188055; BE187804; BB032646; BE037278; BE037125; BE037110; BE037009; BE036024; BE035828; BE035751; BE019724; AW913291; AW912445; AW823912; AW823418; AB023803; AB022344; AW475385; AW323586; AW319308; AW239668; AV253136; AW013716; AW013704; AW013702; AW013696; AW013669; AW013647; AW013501; AW013484; AW013428; AW013404; AW013386; AW013284; AW013183; AF061256; AI956572; AI882550; AI822932; AI785988; AI744273; AI727302; AI725714; AF137375; AF137374; AF137373; AF096320; AF096319; AI663857; AI647841; AI646950; AI607910; AI529173; AI509734; AI506267; AI498269; AI000444; AA956337; AA955042; AA899838; AA899718; AA858756; AI311561; AI385951; AI352406; AF100161; AI326503; AI325517; AI325453; AI325382; AI323700; AI323374; AI313973; AI196928; AF091041; AI156212; AI120374; AI119000; AA408670; AA408072; AA407615; AA995272; C78593; AA999910; AA991491; X99994; X99993; X99992; X99991; X99990; AA958985; AA873222; AA930051; AA895334; AA796142; AA798223; AA734325; AA690871; AA674988; AA674863; AA674821; AA674744; AA671558; AF000381; AF000380; AA637071; AA616314; AA109687; AA608235; AA589050; AA544782; AA522095; AA386821; AA386818; AA386495; AA289278; AA286342; AA276302; AA276123; AA277280; AA273543; U89949; AA208306; AA208089; AA242285; AA139715; AA139709; AA139675; AA139593; AA124010;

AA108790; AA108350; AA028831; AA061275; W82933; AA015571; W71715; W59165; X62753; Z32564; T29279; M25317; M86438; J03922; M64817; L25338; M97701; M97700; M64782; M35069; J05013; M28099; J02876; U08471; U02714; y U02716.

5 Un experto también reconoce que el alcance de la invención no se limita a los nonapéptidos específicos descritos en SEC ID N°: 2 a SEC ID N°: 8. Los antígenos que comprenden un epítipo de FBP pueden ser al menos aproximadamente 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, o hasta aproximadamente 30. Se contempla que cualquier aminoácido pueda usarse para adiciones o llenar el resto de secuencias, además de la secuencia de variante específica proporcionada en el presente documento. Sin embargo, se prefiere que sean aquellos que
10 mantendrán la secuencia subyacente de FBP.

III. Diseño racional de vacunas

15 El objetivo del diseño racional de vacunas es producir análogos estructurales de compuestos biológicamente activos. Creando tales análogos es posible diseñar vacunas que son más activas o estables que las moléculas naturales, que tienen diferente susceptibilidad para alteración o que pueden afectar la función de diversas otras moléculas. En un enfoque, un experto genera una estructura tridimensional para la variante de proteína de unión a folato de la invención o un fragmento de la misma. Esto podría llevarse a cabo por cristalografía de rayos X, modelado informático o por una combinación de ambos enfoques. Un enfoque alternativo implica la sustitución al azar de
20 grupos funcionales mediante la variante de proteína de unión a folato, y se determina el efecto resultante sobre la función.

También es posible aislar un anticuerpo específico para variante de proteína de unión a folato, seleccionado por un ensayo funcional, y luego resolver su estructura cristalina. En principio, este enfoque da un fármaco en el que puede basarse el posterior diseño de vacuna. Es posible evitar la cristalografía de proteínas en conjunto generando anticuerpos antiidiotípicos para un anticuerpo farmacológicamente activo funcional. Como imagen especular de una imagen especular se esperaría que el sitio de unión de antiidiotipo fuera un análogo del antígeno original. El antiidiotipo podría entonces usarse para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos químicamente o biológicamente producidos. Entonces, los péptidos seleccionados servirían de vacuna.
25

30 Así, pueden diseñarse vacunas que tienen actividad biológica potenciada y mejorada, por ejemplo, actividad antitumoral, con respecto a una variante de proteína de unión a folato de partida de la invención. En virtud de procedimientos de aislamiento químicos convencionales y otras descripciones en el presente documento, pueden producirse cantidades suficientes de las variantes de proteína de unión a folato de la invención para realizar estudios cristalográficos. Además, el conocimiento de las características químicas de estos compuestos permite las predicciones empleadas por ordenador de relaciones estructura-función.
35

IV. Reactivos inmunológicos

40 Es muy conocido en la técnica que la inmunogenicidad de una composición de inmunogén particular puede potenciarse por el uso de estimulantes no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Adyuvantes adecuados incluyen todos los compuestos inmunoestimulantes aceptables, tales como citocinas, quimiocinas, cofactores, toxinas, plasmidios, composiciones sintéticas o LEE o CEE que codifican tales adyuvantes.

45 Adyuvantes que pueden usarse incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ -interferón, GMCSF, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos de MDP tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A y monofosforil lípido A (MBL). También se contempla RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión al 2 % de escualeno/Tween 80. Pueden incluso usarse antígenos de MHC. A modo de ejemplo, adyuvantes frecuentemente preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulante no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* destruido), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.
50

Además de los adyuvantes, puede desearse coadministrar modificadores de la respuesta biológica (BRM), que se ha mostrado que regulan por incremento la inmunidad de linfocitos T o regulan por disminución la actividad de células supresoras. Tales BRM incluyen, pero no se limitan a, Cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); ciclofosfamida de baja dosis (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ), citocinas tales como γ -interferón, IL-2 o IL-12 o genes que codifican proteínas que participan en funciones colaboradoras inmunitarias, tales como B-7.
55

Puede usarse una variedad de vías para administrar las vacunas que incluyen, pero no se limitan a, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraepidérmica, intravenosa e intraperitoneal.
60

Un individuo, tal como un paciente, se inyecta con vacuna generalmente como se ha descrito anteriormente. El antígeno puede mezclarse con adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund. Las administraciones de refuerzo con la misma vacuna o ADN que codifica la misma pueden producirse a intervalos de aproximadamente dos semanas.
65

V. Agentes inmunoterapéuticos

Un agente inmunoterapéutico generalmente se basa en el uso de células efectoras inmunitarias y moléculas para elegir como diana y destruir células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, una variante de proteína de unión a folato que es o es similar a un antígeno de célula tumoral. La variante sola puede servir de efector de terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción de células. La variante también puede conjugarse con un fármaco o toxina (por ejemplo, un quimioterapéutico, un radionúclido, una cadena A de ricina, una toxina del cólera, una toxina pertussis, etc.) y servir simplemente como agente que elige diana. Tales conjugados de anticuerpo se llaman inmunotoxinas, y son muy conocidas en la técnica (véase la patente de EE.UU. 5.686.072, la patente de EE.UU. 5.578.706, la patente de EE.UU. 4.792.447, la patente de EE.UU. 5.045.451, la patente de EE.UU. 4.664.911 y la patente de EE.UU. 5.767.072). Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interacciona, tanto directamente como indirectamente, con una diana de célula tumoral. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y células NK.

En un aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral debe poseer algún marcador que sea flexible para la elección como diana, es decir, no está presente en la mayoría de otras células. Existen muchos marcadores tumorales, además de la proteína de unión a folato descrita en el presente documento, y cualquiera de éstos puede ser adecuado para ser elegido como diana en el contexto de la presente invención. Marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de la próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de sialil-Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

Las divulgaciones presentadas en el presente documento tienen relevancia significativa para la inmunoterapia de enfermedades y trastornos humanos, que incluyen cáncer. En el uso de composiciones inmunoterapéuticas derivadas del antígeno de la presente invención en procedimientos de tratamiento también pueden emplearse otros tratamientos convencionales tales como radioterapia o quimioterapia. Sin embargo, se prefiere usar la inmunoterapia sola inicialmente ya que su eficacia puede evaluarse fácilmente. Las inmunoterapias del cáncer pueden clasificarse ampliamente como adoptivas, pasivas y activas, como se describe en las siguientes secciones, y pueden usarse o producirse con el antígeno de la variante de proteína de unión a folato de la presente invención.

A. Inmunoestimulantes

Un aspecto específico de la inmunoterapia es usar una molécula inmunoestimulante como agente, o más preferentemente conjuntamente con otro agente, tal como, por ejemplo, una citocina tal como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, factor de necrosis tumoral; interferones alfa, beta y gamma; F42K y otros análogos de citocina; una quimiocina tal como, por ejemplo, MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES, IL-8; o un factor de crecimiento tal como, por ejemplo, ligando de FLT3.

Una citocina particular contemplada para su uso en la presente invención es el factor de necrosis tumoral. El factor de necrosis tumoral (TNF; caquectina) es una glicoproteína que destruye algunos tipos de células cancerosas, activa la producción de citocinas, activa macrófagos y células endoteliales, promueve la producción de colágeno y colagenasas, es un mediador inflamatorio y también un mediador de choque séptico, y promueve el catabolismo, fiebre y sueño. Algunos agentes infecciosos producen la regresión tumoral mediante la estimulación de la producción de TNF. El TNF puede ser bastante tóxico cuando se usa solo en dosis eficaces, de manera que las pautas óptimas probablemente lo usarán en menores dosis en combinación con otros fármacos. Sus acciones inmunosupresoras son potenciadas por gamma-interferón, de manera que la combinación es posiblemente peligrosa. También se ha encontrado que un híbrido de TNF e interferón- α posee actividad contra el cáncer.

Otra citocina específicamente contemplada es interferón alfa. Se ha usado interferón alfa en el tratamiento de leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoide, cáncer de células renales, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, linfomas no Hodgkin, micosis fungoides, mieloma múltiple y leucemia granulocítica crónica.

B. Inmunoterapia pasiva

Existen varios enfoques diferentes para la inmunoterapia pasiva del cáncer. Pueden clasificarse ampliamente en los siguientes: inyección de vacuna sola; inyección de vacuna acoplada a toxinas o agentes quimioterapéuticos; inyección de vacuna acoplada a isótopos radiactivos; inyección de vacuna antiidiotipo; y finalmente, purgado de células tumorales en médula ósea.

Puede ser favorable administrar más de una vacuna asociada a dos antígenos diferentes o incluso vacuna con múltiple especificidad por antígenos. Los protocolos de tratamiento también pueden incluir administración de linfocinas u otros potenciadores inmunitarios (Bajorin y col. 1988).

C. Inmunoterapia activa

En algunas realizaciones de la invención puede emplearse inmunoterapia activa. En la inmunoterapia activa se

administra una variante de proteína de unión a folato (por ejemplo, un péptido o polipéptido), un ácido nucleico que codifica una variante de proteína de unión a folato y/o componentes de vacuna adicionales, tales como, por ejemplo, una célula que expresa la variante de proteína de unión a folato (por ejemplo, una célula dendrítica fusionada con una célula tumoral, o una composición de células tumorales autólogas o alogenas que expresan el antígeno), un adyuvante, una proteína recombinante, un inmunomodulador y similares (Ravindranath y Morton, 1991; Morton y Ravindranath, 1996; Morton y col., 1992; Okamoto y col., 1997; Kugler y col., 2000; Trefzer y col., 2000; Mitchell y col., 1990; Mitchell y col., 1993).

Un péptido antigénico, polipéptido o proteína, o una composición de células tumorales autólogas o alogenas o "vacuna", se administra generalmente con un adyuvante bacteriano distinto (Ravindranath y Morton, 1991; Morton y Ravindranath, 1996; Morton y col., 1992; Mitchell y col., 1990; Mitchell y col., 1993). En la inmunoterapia del melanoma, aquellos pacientes que provocan alta respuesta de IgM frecuentemente sobreviven mejor que aquellos que no provocan anticuerpos o provocan bajos anticuerpos IgM (Morton y col., 1992). Los anticuerpos IgM son frecuentemente anticuerpos transitorios y la excepción a la regla parecer ser anticuerpos anti-gangliósido o anti-hidrato de carbono.

D. Inmunoterapia adoptiva

En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos circulantes del paciente, o linfocitos infiltrados en tumores, se aíslan *in vitro*, se activan por linfocinas tales como IL-2 o se transducen con genes para necrosis tumoral, y se readministran (Rosenberg y col., 1988; 1989). Para lograr esto se administraría a un animal, o paciente humano, una cantidad inmunológicamente eficaz de linfocitos activados en combinación con una composición de péptido antigénica incorporada en adyuvante como se ha descrito en el presente documento. Los linfocitos activados serán lo más preferentemente las propias células del paciente que se aislaron anteriormente de una sangre o muestra tumoral y se activaron (o "expandieron") *in vitro*. En ciertas realizaciones, los linfocitos del paciente se cultivan o expanden en número o se seleccionan para actividad, tal como inmunorreactividad para el antígeno. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanoma y carcinoma renal.

VI. Vacunas

La presente invención contempla vacunas para su uso en realizaciones de inmunización tanto activa como pasiva. Las composiciones inmunogénicas, propuestas por ser adecuadas para su uso como vacuna, pueden prepararse lo más fácilmente directamente a partir de péptidos estimulantes de CTL inmunogénicos preparados de un modo desvelado en el presente documento. Preferentemente, el material antigénico se dializa ampliamente para eliminar moléculas de peso molecular pequeño no deseadas y/o se liofilizan para la formulación más lista en un vehículo deseado.

La preparación de vacunas que contienen secuencias de péptidos como principios activos se entiende generalmente bien en la materia, como se ejemplifica por las patentes de EE.UU. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770. Normalmente, tales vacunas se preparan como inyectables. También puede prepararse bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones: formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de inyección. La preparación también puede emulsionarse. El componente inmunógeno activo se mezcla frecuentemente con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, o adyuvantes que potencian la eficacia de las vacunas.

Las vacunas pueden administrarse convencionalmente parenteralmente, mediante inyección, por ejemplo, tanto subcutáneamente como intramuscularmente. Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialcalenoglicoles o triglicéridos: tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 %, preferentemente aproximadamente el 1 a aproximadamente el 2 %. Formulaciones orales incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 95 % de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 70 %.

Los péptidos de la presente invención pueden formularse en la vacuna como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del péptido) y aquellas que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol,

histidina, procaína y similares.

Las vacunas se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en cantidad tal que será terapéuticamente eficaz e inmunogénica. La cantidad que va a administrarse depende del sujeto que va a tratarse, que incluye, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseado. Cantidades precisas de principio activo requeridas para ser administradas dependen del criterio del médico. Sin embargo, intervalos de dosificación adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de principio activo por vacunación. También son variables pautas adecuadas para la administración inicial y vacunas de refuerzo, pero están tipificadas por una administración inicial, seguida de inoculaciones posteriores u otras administraciones.

El modo de aplicación puede variarse ampliamente. Es aplicable cualquiera de los procedimientos convencionales para administración de una vacuna. Se cree que éstos incluyen administración oral sobre una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, parenteralmente, mediante inyección o similares. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará según el tamaño del huésped.

Diversos procedimientos de conseguir el efecto adyuvante para la vacuna incluyen uso de agentes tales como hidróxido de aluminio o fosfato (alumbre), comúnmente usados como disolución a aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 0,1% en solución salina tamponada con fosfato, mezcla con polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol®) usados como una disolución a aproximadamente el 0,25 %, agregación de la proteína en la vacuna por tratamiento térmico con temperaturas que oscilan entre aproximadamente 70 ° y aproximadamente 101 °C durante un periodo de 30 segundos a 2 minutos, respectivamente. También puede emplearse agregación por reactivación con anticuerpos tratados con pepsina (Fab) para albúmina, mezcla con células bacterianas tales como *C. parvum* o endotoxinas o componentes de lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas, emulsión en vehículos de aceite fisiológicamente aceptables tales como mono-oleato de manida (Aracel A) o emulsión con una disolución al 20 % de un perfluorocarbono (Fluosol-DA®) usado como un sustituto de bloques.

En muchos casos se deseará tener múltiples administraciones de la vacuna, normalmente que no superen seis vacunaciones, más normalmente que no superen cuatro vacunaciones y preferentemente una o más, normalmente al menos aproximadamente tres vacunaciones. Las vacunaciones serán normalmente en intervalos de dos a doce semanas, más normalmente intervalos de tres a cinco. Se desearán refuerzos periódicos a intervalos de 1-5 años, normalmente tres años, para mantener niveles protectores de los anticuerpos. El transcurso de la inmunización puede ir seguido de ensayos para anticuerpos para los antígenos en sobrenadante. Los ensayos pueden realizarse marcando con marcas convencionales, tales como radionúclidos, enzimas, fluorescentes y similares. Estas técnicas son muy conocidas y pueden encontrarse en una amplia variedad de patentes, tales como las patentes de EE.UU. nº 3.791.932; 4.174.384 y 3.949.064, como ilustrativos de estos tipos de ensayos.

Para que una composición antigénica sea útil como una vacuna, una composición antigénica debe inducir una respuesta inmunitaria al antígeno en una célula, tejido o animal (por ejemplo, un ser humano). Como se usa en el presente documento, una "composición antigénica" puede comprender un antígeno (por ejemplo, un péptido o polipéptido), un ácido nucleico que codifica un antígeno (por ejemplo, un vector de expresión de antígeno), o una célula que expresa o que presenta un antígeno. En realizaciones particulares, la composición antigénica comprende o codifica una variante de proteína de unión a folato, o un equivalente inmunológicamente funcional de la misma. En otras realizaciones, la composición antigénica está en una mezcla que comprende un agente inmunoestimulante adicional o ácidos nucleicos que codifican tal agente. Agentes inmunoestimulantes incluyen, pero no se limitan a, un antígeno adicional, un inmunomodulador, una célula presentadora de antígeno o un adyuvante. En otras realizaciones, uno o más de los agentes adicionales está covalentemente unido al antígeno o un agente inmunoestimulante, en cualquier combinación. En ciertas realizaciones, la composición antigénica está conjugada con o comprende aminoácidos del motivo de anclaje de HLA.

En ciertas realizaciones, una composición antigénica o equivalente inmunológicamente funcional puede usarse como vacuna eficaz en inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células de anti-variante de proteína de unión a folato en un animal. La presente invención contempla una o más composiciones antigénicas o vacunas para su uso en tanto realizaciones de inmunización activas como pasivas.

Una vacuna de la presente invención puede variar en su composición de componentes proteínicos, de ácido nucleico y/o celular. En un ejemplo no limitante, un ácido nucleico que codifica un antígeno también podría formularse con un adyuvante proteínico. Por supuesto, se entenderá que diversas composiciones descritas en el presente documento pueden comprender además componentes adicionales. Por ejemplo, uno o más componentes de vacuna pueden estar comprendidos en un lípido o liposoma. En otro ejemplo no limitante, una vacuna puede comprender uno o más adyuvantes. Una vacuna de la presente invención, y sus diversos componentes, pueden prepararse y/o administrarse mediante cualquier procedimiento desvelado en el presente documento o como sería conocido para un experto habitual en la materia, en vista de la presente divulgación.

A. Antígenos proteínáceos

Se entiende que una composición antigénica de la presente invención puede prepararse mediante un procedimiento que es muy conocido en la técnica; que incluye, pero no se limita a, síntesis química por síntesis en fase sólida y purificación lejos de los otros productos de las reacciones químicas por HPLC, o producción por la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, una secuencia de ADN) que codifica un péptido o polipéptido que comprende un antígeno de la presente invención en un sistema de traducción *in vitro* o en una célula viva. Preferentemente, la composición antigénica se aísla y se dializa ampliamente para eliminar una o más moléculas de peso molecular pequeño no deseadas y/o liofiliza para formulaciones más listas en un vehículo deseado. Se entiende adicionalmente que aminoácidos adicionales, mutaciones, modificación química y similares, si los hay, que se hacen en un componente de vacuna no interferirán preferentemente sustancialmente con el reconocimiento de anticuerpo de la secuencia epitópica.

Un péptido o polipéptido correspondiente a uno o más determinantes antigénicos de la variante de proteína de unión a folato de la presente invención debe generalmente tener al menos cinco o seis residuos de aminoácidos en longitud, y puede contener hasta aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, o más. Una secuencia de péptidos puede sintetizarse mediante procedimientos conocidos para aquellos expertos habituales en la materia, por ejemplo, síntesis de péptidos usando máquinas de síntesis de péptidos automatizadas tales como aquellas disponibles de Applied Biosystems (Foster City, CA).

También pueden prepararse péptidos o polipéptidos más largos, por ejemplo, por medios recombinantes. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que codifica una composición antigénica y/o un componente descrito en el presente documento puede usarse, por ejemplo, para producir una composición antigénica *in vitro* o *in vivo* para las diversas composiciones y procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un antígeno está comprendido en, por ejemplo, un vector en una célula recombinante. El ácido nucleico puede expresarse para producir un péptido o polipéptido que comprende una secuencia antigénica. El péptido o polipéptido puede secretarse de la célula, o estar comprendido como parte de o dentro de la célula.

B. Antígenos de vacuna genética

En ciertas realizaciones, una respuesta inmunitaria puede promoverse transfectando o inoculando un animal con un ácido nucleico que codifica un antígeno. Entonces, una o más células comprendidas dentro de un animal expresan las secuencias codificadas por el ácido nucleico después de la administración del ácido nucleico al animal. Así, la vacuna puede comprender "vacuna genética" útil para los protocolos de inmunización. Una vacuna también puede estar en forma de, por ejemplo, un ácido nucleico (por ejemplo, un ADNc o un ARN) que codifica toda o parte de la secuencia de péptidos o de polipéptidos de un antígeno. La expresión *in vivo* por el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, por un plásmido tipo vector, un vector viral o un vector de construcción viral/de plásmido.

En aspecto preferidos, el ácido nucleico comprende una región codificante que codifica toda o parte de las secuencias desveladas como SEC ID N°: 2 a SEC ID N°: 8, o un equivalente inmunológicamente funcional de las mismas. Por supuesto, el ácido nucleico puede comprender y/o codificar secuencias adicionales, que incluyen, pero no se limitan a, aquellas que comprenden uno o más inmunomoduladores o adyuvantes. Previamente se han desvelado secuencias codificantes de nucleótidos y proteínas, polipéptidos y péptidos para diversos genes, y pueden encontrarse en bases de datos computerizadas conocidas para aquellos expertos habituales en la materia. Una base de datos tal son las bases de datos Genbank y GenPept del Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las regiones codificantes para estos genes conocidos pueden amplificarse, combinarse con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la variante de proteína de unión a folato desvelada en el presente documento (por ejemplo, ligarse) y/o expresarse usando las técnicas desveladas en el presente documento, o por cualquier técnica que sería conocida para aquellos expertos habituales en la materia (por ejemplo, Sambrook y col., 1987). Aunque un ácido nucleico puede expresarse en un sistema de expresión *in vitro*, en realizaciones preferidas el ácido nucleico comprende un vector para la replicación y/o expresión *in vivo*.

C. Antígenos de vacunas celulares

En otra realización, una célula que expresa el antígeno puede comprender la vacuna. La célula puede aislarse de un cultivo, tejido, órgano u organismo y administrarse a un animal como vacuna celular. Así, la presente invención contempla una "vacuna celular". La célula puede transfectarse con un ácido nucleico que codifica un antígeno para potenciar su expresión del antígeno. Por supuesto, la célula puede también expresar uno o más componentes adicionales de vacuna, tales como inmunomoduladores o adyuvantes. Una vacuna puede comprender toda o parte de la célula.

D. Equivalentes inmunológicamente funcionales

Pueden hacerse modificación y cambios en la estructura de los péptidos de la presente invención y segmentos de ADN que los codifican y todavía obtener una molécula funcional que codifica una proteína o péptido con características deseables. Lo siguiente es una discusión basada en cambiar los aminoácidos de una proteína para crear una molécula de segunda generación equivalente, o incluso mejorada. Los cambios de aminoácidos pueden lograrse cambiando los codones de la secuencia de ADN, según la siguiente tabla de codones:

Tabla 1

	Amino ácidos		Codones	
5	Alanina	Ala	A	OCA GCC GCG GCU
	Cisteína	Cys	C	UGC UGU
	Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
	Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
10	Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
	Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
	Histidina	His	H	CAC CAU
	Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU
15	Lisina	Lys	K	AAA AAG
	Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
	Metionina	Met	M	AUG
	Asparagina	Asn	N	AAC AAU
20	Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
	Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
	Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
	Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
25	Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
	Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
	Triptófano	Trp	W	UGG
	Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

30 Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse con otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión al antígeno de anticuerpos o sitios de unión sobre moléculas de sustrato. Como es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína la que define la actividad biológica funcional de esa proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos en una secuencia de proteínas, y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente, y, sin embargo, obtener una proteína con propiedades similares. Así, se contempla por los inventores que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de péptidos de las composiciones desveladas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican los péptidos, sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica. Las sustituciones de aminoácidos pueden basarse en la similitud relativa de los sustituyentes de cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Sustituciones a modo de ejemplo que tienen en cuenta diversas de las anteriores características son muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

45 También se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria, y a la identificación de un epítipo, de análisis de una secuencia de aminoácidos (Chou y Fasman, 1974a,b; 1978a,b, 1979). Cualquiera de estos puede usarse, si se desea, para complementar las enseñanzas de la patente de EE.UU. 4.554.101.

50 Además, actualmente están disponibles programas informáticos para ayudar a predecir una porción antigénica y una región central epitópica de una o más proteínas, polipéptidos o péptidos. Ejemplos incluyen aquellos programas basados en el análisis de Jameson-Wolf (Jameson & Wolf, 1988; Wolf y col., 1988), el programa PepPlot® (Brutlag y col., 1990; Weinberger y col., 1985) y otros programas nuevos para la predicción de estructuras terciarias de la proteína (Fetrow & Bryant, 1993). Otro programa de software comercialmente disponible que puede llevar a cabo tales análisis es MacVector (IBI, New Haven, CT).

55 Como pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de una composición antigénica (por ejemplo, una variante de proteína de unión a folato) de la presente invención, y todavía obtener moléculas que tienen características similares o de otro modo deseables, tales equivalentes inmunológicamente funcionales también están englobados dentro de la presente invención.

60 Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse con otros aminoácidos en una estructura de péptido, polipéptido o proteína sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión al antígeno de anticuerpos, sitios de unión sobre las moléculas de sustrato o receptores, sitios de unión al ADN o semejantes. Como es la capacidad interactiva y naturaleza de un péptido, polipéptido o proteína que define su actividad funcional biológica (por ejemplo, inmunológica), ciertas sustituciones de secuencias de aminoácidos pueden hacerse en una secuencia de aminoácidos (o, por supuesto, su secuencia codificante de ADN subyacente) y, sin embargo, obtener un péptido o polipéptido con propiedades similares (agonista). Así, se

contempla por los inventores que pueden hacerse diversos cambios en la secuencia de una composición antigénica tal como, por ejemplo, un péptido o polipéptido de la variante de proteína de unión a folato, o ADN subyacente, sin pérdida apreciable de la utilidad o actividad biológica.

- 5 Por consiguiente, la composición antigénica, particularmente un equivalente inmunológicamente funcional de las secuencias desveladas en el presente documento, pueden englobar una secuencia de moléculas de amino que comprende al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en proteínas naturalmente sintetizadas, o al menos un aminoácido modificado o no natural, que incluye, pero no se limita a, aquellos mostrados en la siguiente Tabla 2.

10 **TABLA 2: Aminoácidos modificados, no naturales o raros**

	Abreviatura	Aminoácido	Abreviatura	Aminoácido
	Aad	2-Ácido aminoadípico	EtAsn	N- etilasparagina
15	Baad	3- Ácido aminoadípico	Hyl	Hidroxilisina
	Bala	β -alanine, b-Amino-propionic acid	Ahyl	Allo-Hidroxilisina
	Abu	2-Ácido aminobutírico	3Hyp	3- Hidroxiprolina
	4Abu	4- Ácido aminobutírico, ácido piperidínico	4Hyp	4- Hidroxiprolina
20	Acp	6- Ácido aminocaproico	Ide	Isodesmosina
	Ahe	2- ácido aminoheptanoico	Aile	Allo-isoleucina
	Aib	2- ácido aminoisobutírico	MeGly	N-metilglicina, sarcosina
25	Baib	3- ácido aminoisobutírico	Melle	N- metilisoleucina
	Apm	2- ácido aminopimélico	MeLys	6-N-metililisina
	Dbu	2,4- ácido diaminobutírico	MeVal	N-metilvalina
	Des	Desmosina	Nva	Norvalina
30	Dpm	2,2'- ácido diaminopimélico	Nle	Norleucina
	Dpr	2,3- ácido diaminopropiónico	Ore	Ornitina
	EtGly	N- etilglicina		

35 En términos de equivalente inmunológicamente funcional, es bien entendido por el experto que, inherente en la definición está el concepto de que hay un límite al número de cambios que pueden hacerse dentro de una porción definida de la molécula y todavía producir una molécula con un nivel aceptable de actividad inmunológica equivalente. Así, un péptido o polipéptido inmunológicamente funcional equivalente se define en el presente documento como aquellos péptido(s) o polipéptido(s) en los que ciertos, no la mayoría o todos, del (de los) aminoácido(s) puede(n) estar sustituido(s).

40 En particular, si se refiere a un péptido de longitud más corta, se contempla que menos sustituciones de aminoácidos deben hacerse dentro del péptido dado. Un polipéptido más largo puede tener un número intermedio de cambios. La proteína de longitud completa tendrá la mayor tolerancia para un mayor número de cambios. Por supuesto, puede hacerse fácilmente una pluralidad de distintos polipéptidos/péptidos con diferentes sustituciones y usarse según la invención.

45 También es muy sabido que si se muestra que ciertos residuos son particularmente importantes para las propiedades inmunológicas o estructurales de una proteína o péptido, por ejemplo, residuos en regiones de unión o sitios activos, tales residuos no pueden generalmente intercambiarse. Esto es una consideración importante en la presente invención, en la que cambios en el sitio antigénico de variante de proteína de unión a folato deben considerarse cuidadosamente y posteriormente probarse para garantizar el mantenimiento de la función inmunológica (por ejemplo, antigenicidad), cuando se desee el mantenimiento de la función inmunológica. De este modo, equivalentes funcionales se definen en el presente documento como aquellos péptidos o polipéptidos que

50 mantienen una cantidad sustancial de su actividad inmunológica nativa.

Las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos revela que la arginina, lisina y histidina son todos residuos positivamente cargados; que la alanina, glicina y serina son todos de un tamaño similar; y que la fenilalanina, triptófano y tirosina tienen todos una forma generalmente similar. La selección cuidadosa de una sustitución particular de aminoácidos para un péptido, a diferencia de una proteína, debe considerarse dadas las diferencias en tamaño entre péptidos y proteínas.

65 En otras realizaciones, determinantes antigénicos importantes de un péptido o polipéptido pueden identificarse por un enfoque empírico en el que las porciones de un ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido se expresan

en un huésped recombinante, y el péptido(s) o polipéptido(s) resultante(s) se prueba(n) para su capacidad para provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, puede usarse PCR™ para preparar una variedad de péptidos o polipéptidos que carece de fragmentos sucesivamente más largos del extremo C de la secuencia de aminoácidos. La inmunoreactividad de cada uno de estos péptidos o polipéptidos se determina para identificar aquellos fragmentos o dominios que son inmunodominantes. Otros estudios en los que solo se elimina un pequeño número de aminoácidos en cada iteración permite entonces determinar con más precisión la localización del (de los) determinante(s) antigénico(s) del péptido o polipéptido.

Otro procedimiento para determinar un determinante antigénico importante de un péptido o polipéptido es el sistema SPOTs™ (Genosys Biotechnologies, Inc., The Woodlands, TX). En este procedimiento, péptidos solapantes se sintetizan sobre una membrana de celulosa, que tras la síntesis y desprotección, se criba usando un anticuerpo policlonal o monoclonal. Un determinante antigénico de los péptidos o polipéptidos que se identifican inicialmente puede localizarse adicionalmente realizando síntesis posteriores de péptidos más pequeños con solapamientos mayores, y sustituyendo eventualmente aminoácidos individuales en cada posición a lo largo de la secuencia inmunorreactiva.

Una vez se han completado uno o más de tales análisis, se prepara una composición antigénica tal como, por ejemplo, un péptido o un polipéptido que contiene al menos las características esenciales de uno o más determinantes antigénicos. Entonces se emplea una composición antigénica en la generación de antiseros contra la composición, y preferentemente (el) los determinante(s) antigénico(s).

Aunque la discusión se ha basado en polipéptidos funcionalmente equivalentes que se producen a partir de cambios de aminoácidos, se apreciará que estos cambios pueden efectuarse por alteración del ADN codificante; teniendo también en cuenta que el código genético está degenerado y que dos o más codones pueden codificar el mismo aminoácido. Los ácidos nucleicos que codifican estas composiciones antigénicas también pueden construirse e insertarse en uno o más vectores de expresión mediante procedimientos convencionales (Sambrook y col., 1987), por ejemplo, usando metodología de clonación por PCR™.

Además de los compuestos de peptidilo descritos en el presente documento, los inventores también contemplan que pueden formularse otros compuestos estéricamente similares para imitar las porciones clave de la estructura del péptido o polipéptido o para interactuar específicamente con, por ejemplo, un anticuerpo. Tales compuestos, que pueden llamarse peptidomiméticos, pueden usarse del mismo modo que un péptido o polipéptido de la invención y de ahí que también sean equivalentes inmunológicamente funcionales.

Ciertos miméticos que imitan elementos de estructura secundaria de proteína se describen en Johnson y col. (1993). El fundamento subyacente al uso de peptidomiméticos es que el esqueleto de péptidos de proteínas existe principalmente para orientar cadenas laterales de aminoácidos de tal forma que se faciliten las interacciones moleculares, tales como aquellas de anticuerpo y antígeno. Así se diseña un peptidomimético para permitir interacciones moleculares similares a la molécula natural.

E. Mutagénesis de antígenos

En realizaciones particulares, una composición antigénica se muta para fines tales como, por ejemplo, potenciamiento de su inmunogenicidad o producción o identificación de una secuencia equivalente inmunológicamente funcional. Los procedimientos de mutagénesis son muy conocidos para aquellos expertos en la materia (Sambrook y col., 1987).

Como se usa en el presente documento, el término "procedimiento de mutagénesis dirigida a oligonucleótidos" se refiere a procedimientos dependientes del molde y propagación mediada por vectores que producen un aumento en la concentración de una molécula de ácido nucleico específica con respecto a su concentración inicial, o en un aumento en la concentración de una señal detectable, tal como amplificación. Como se usa en el presente documento, el término "procedimiento de mutagénesis dirigida a oligonucleótidos" pretende referirse a un procedimiento que implica la extensión dependiente del molde de una molécula de cebador. El término procedimiento dependiente del molde se refiere a la síntesis de ácidos nucleicos de una molécula de ARN o ADN en la que la secuencia de la hebra recientemente sintetizada de ácido nucleico está impuesta por las reglas muy conocidas del apareamiento de bases complementarias (véase, por ejemplo, Watson, 1987). Normalmente, las metodologías mediadas por vector implican la introducción del fragmento de ácido nucleico en un vector de ADN o ARN, la amplificación clónica del vector y la recuperación del fragmento de ácido nucleico amplificado. Ejemplos de tales metodologías se proporcionan por la patente de EE.UU. 4.237.224.

En una realización preferida se usa mutagénesis dirigida al sitio. La mutagénesis específica para el sitio es una técnica útil en la preparación de una composición antigénica (por ejemplo, un péptido o polipéptido que comprende variante de proteína de unión a folato, o proteína, polipéptido o péptido equivalente inmunológicamente funcional), mediante mutagénesis específica del ADN subyacente. En general, la técnica de mutagénesis específica para el sitio es muy conocida en la técnica. La técnica proporciona además una capacidad lista para preparar y probar variantes de secuencia, incorporando una o más de las consideraciones anteriores, introduciendo uno o más cambios de

secuencias de nucleótidos en el ADN. La mutagénesis específica para sitio permite la producción de un mutante mediante el uso de secuencia(s) de oligonucleótidos específica(s) que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, además de un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebadores de tamaño y complejidad de secuencias suficiente para formar un dúplex estable en ambos lados de la posición que se muta. Normalmente se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a aproximadamente 75 nucleótidos en longitud, con aproximadamente 10 a aproximadamente 25 o más residuos en ambos lados de la posición que se altera, mientras que son más preferidos los cebadores de aproximadamente 17 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, estando alterados aproximadamente 5 a 10 residuos en ambos lados de la posición.

En general, la mutagénesis dirigida al sitio se realiza obteniendo primero un vector monocatenario, o fundiendo dos cadenas de un vector bicatenario que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica la proteína deseada. Como será apreciado por un experto habitual en la materia, la técnica normalmente emplea un vector de bacteriófago que existe en tanto una forma monocatenaria como bicatenaria. Vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida al sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos vectores de fago están comercialmente disponibles y su uso es generalmente muy conocido para aquellos expertos en la materia. Los plásmidos bicatenarios también se emplean rutinariamente en la mutagénesis dirigida al sitio, que elimina la etapa de transferir el gen de interés de un fago a un plásmido.

Este cebador mutagénico se hibrida entonces con la preparación de ADN monocatenaria y se somete a enzimas que polimerizan ADN tales como, por ejemplo, fragmento de Klenow de polimerasa I de *E. coli* con el fin de completar la síntesis de la hebra que lleva la mutación. Así, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica la secuencia no mutada original y la segunda hebra lleva la mutación deseada. Este vector de heterodúplex se usa entonces para transformar células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que llevan la disposición de secuencia mutada.

Alternativamente, un par de cebadores pueden hibridarse con dos hebras separadas de un vector bicatenario para sintetizar simultáneamente ambas hebras complementarias correspondientes con la mutación (mutaciones) deseada(s) en una reacción de PCR™. Se ha concebido un esquema de selección genética para enriquecer clones que incorporan el oligonucleótido mutagénico (Kunkel y col., 1987). Alternativamente, el uso de PCR™ con enzimas termoestables comercialmente disponibles tales como Taq polimerasa puede usarse para incorporar un cebador de oligonucleótidos mutagénico en un fragmento de ADN amplificado que puede entonces clonarse en un vector de clonación o de expresión apropiado (Tomic y col., 1990; Uppender y col., 1995). También puede usarse una PCR™ empleando una ligasa termostable, además de una polimerasa termostable, para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado en un fragmento de ADN amplificado que puede entonces clonarse en un vector de clonación o de expresión apropiado (Michael 1994).

La preparación de variantes de secuencia del gen seleccionado usando mutagénesis dirigida al sitio se proporciona como un medio de producción de especies posiblemente útiles y no pretende ser limitante, ya que hay otras formas en las que pueden obtenerse variantes de secuencias de genes. Por ejemplo, los vectores recombinantes que codifican el gen deseado pueden tratarse con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia.

Adicionalmente, una técnica de mutagénesis particularmente útil es la mutagénesis de barrido con alanina en la que varios residuos se sustituyen individualmente con el aminoácido alanina de manera que pueden determinarse los efectos de perder interacciones de cadenas laterales, mientras que se minimiza el riesgo de perturbaciones a gran escala en la conformación de proteínas (Cunningham y col., 1989).

F. Vectores

Con el fin de efectuar la replicación, expresión o mutagénesis de un ácido nucleico, el ácido nucleico puede administrarse ("transfectarse") a una célula. La transfección de células puede usarse, en ciertas realizaciones, para producir recombinantemente uno o más componentes de vacuna para la posterior purificación y preparación en una vacuna farmacéutica. En otras realizaciones, el ácido nucleico puede comprender una vacuna genética que se administra a un animal. En otras realizaciones, el ácido nucleico se transfecta en una célula y la célula se administra a un animal como componente de vacuna celular. El ácido nucleico puede consistir solo en ADN recombinante desnudo, o puede comprender, por ejemplo, materiales adicionales para proteger el ácido nucleico y/o ayudar en su elección de diana para tipos de células específicas.

El término "vector" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que una secuencia de ácidos nucleicos puede insertarse para la introducción en una célula en la que puede replicarse. Una secuencia de ácidos nucleicos puede ser "exógena", que significa que es extraña a la célula en la que el vector está siendo introducido o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que la secuencia generalmente no se encuentra. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Maniatis y col., 1988 y Ausubel y col., 1994).

El término “vector de expresión” se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN que puede transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen entonces en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de “secuencias de control” que se refieren a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la transcripción y posiblemente traducción de una secuencia codificante operativamente ligada en una célula huésped particular.

El ácido nucleico que codifica la composición antigénica u otro componente de vacuna puede integrarse establemente en el genoma de la célula, o puede mantenerse establemente mantenido en la célula como un segmento de ADN episómico separado. Tales segmentos de ácidos nucleicos o “episomas” codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y replicación independiente de o en sincronización con el ciclo de la célula huésped. Los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que también sirven a otra función y se describen más adelante. Cómo la construcción de expresión se administra a una célula y dónde en la célula queda el ácido nucleico depende del tipo de construcción de expresión empleado.

1. Promotores y potenciadores

Un “promotor” es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácidos nucleicos en la que la iniciación y tasa de transcripción están controlados. Puede contener elementos genéticos en los que proteínas y moléculas reguladoras pueden unirse, tales como ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácidos nucleicos. Los términos “operativamente posicionado”, “operativamente ligado”, “bajo el control” y “bajo el control transcripcional” significan que un promotor está en una localización funcional correcta y/u orientación en relación con una secuencia de ácidos nucleicos para controlar la iniciación de la transcripción y/o expresión de esa secuencia.

Un promotor generalmente comprende una secuencia que funciona posicionando el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El mejor ejemplo conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tal como, por ejemplo, un promotor para el gen desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y un promotor para los genes tardíos SV40, un elemento discreto que recubre el propio sitio de inicio ayuda a fijar el sitio de iniciación. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación de la transcripción. Normalmente, éstos se localizan en la región 30-110 pb en la dirección 5' del sitio de inicio, aunque también se ha mostrado que varios promotores contienen elementos funcionales en la dirección 3' del sitio de iniciación. Para poner una secuencia codificante “bajo el control de” un promotor, el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción del marco de lectura transcripcional se posiciona “en la dirección 3'” (es decir, 3') del promotor elegido. El promotor “en la dirección 5'” estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

La separación entre elementos promotores frecuentemente es flexible, de manera que la función del promotor se preserva cuando los elementos se invierten o se mueven los unos con respecto a los otros. En el promotor tk, la separación entre elementos promotores puede aumentarse a 50 pb antes de que la actividad empiece a disminuir. Dependiendo de un promotor, parece que elementos individuales pueden funcionar tanto cooperativamente como independientemente para activar la transcripción. Un promotor puede o puede no usarse conjuntamente con un “potenciador”, que se refiere a una secuencia reguladora que actúa *in cis* que participa en la activación transcripcional de una secuencia de ácidos nucleicos.

Un promotor puede ser uno naturalmente asociado a una secuencia de ácidos nucleicos, como puede obtenerse aislando las secuencias no codificantes en 5' localizadas en la dirección 5' del segmento codificante y/o exón. Un promotor tal puede denominarse “endógeno”. Similarmente, un potenciador puede ser uno naturalmente asociado a una secuencia de ácidos nucleicos, localizado tanto en la dirección 3' como en la dirección 5' de esa secuencia. Alternativamente, se obtendrán ciertas ventajas posicionando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente se asocia a una secuencia de ácidos nucleicos en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo también se refiere a un potenciador normalmente no asociado a una secuencia de ácidos nucleicos en su entorno natural. Tales promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores que “no se producen naturalmente”, es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones transcripcionales reguladoras, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que son los más comúnmente usados en la construcción de recombinación de ADN incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa (penicilinas), lactosa y triptófano (trp). Además de producir secuencias de ácidos nucleicos de promotores y potenciadores sintéticamente, las secuencias pueden producirse usando tecnología de clonación recombinante y/o de amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen PCRTM, a propósito de las composiciones desveladas en el presente documento (véanse las patentes de EE.UU. n.º 4.683.202 y 5.928.906). Además, se contempla que también pueden emplearse secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos y similares.

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirige eficazmente la expresión del segmento de ADN en los orgánulos, tipo de célula, tejido, órgano u organismo elegido para la expresión. Aquellos

expertos en la materia de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Sambrook y col. 1989). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles bajo las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas recombinantes y/o péptidos. Un promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Adicionalmente también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador (según, por ejemplo, la base de datos de promotores eucariotas EPDB, <http://www.epd.isb-sib.ch/>) para accionar la expresión. El uso de un sistema de expresión citoplásmico T3, T7 o SP6 es otra posible realización. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplásmica de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, tanto como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión genética adicional.

La Tabla 3 enumera ejemplos no limitantes de elementos/promotores que pueden emplearse, en el contexto de la presente invención, para regular la expresión de un ARN. La Tabla 4 proporciona ejemplos no limitantes de elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácidos nucleicos que pueden activarse en respuesta a un estímulo específico.

<p style="text-align: center;">TABLA 3 Promotor y/o potenciador</p>	
Promotor/potenciador	Referencias
Inmunoglobulina de la cadena pesada	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
Inmunoglobulina de la cadena ligera	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
Receptor de células T	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ a y/o DQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β-Interferón	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
Interleucina-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
Receptor de interleuquina 2	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHC Clase II 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHC Clase II HLA-DRA	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β-Actina	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
Creatina quinasa muscular (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
Prealbúmina (Transtiretina)	Costa <i>et al.</i> , 1988
Elastasa I	Omitz <i>et al.</i> , 1987
Metallothionein (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
Colagenasa	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
Albúmina	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α-Fetoproteína	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
t-Globina	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β-Globina	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
Insulina	Edlund <i>et al.</i> , 1985
Molecula de adhesión de célula neuronal (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
α1-Antitripsina	Latimer <i>et al.</i> , 1990

(Continuación)

TABLA 3 Promotor y/o potenciador	
Promotor/potenciador	Referencias
H2B (TH2B) Histona	Hwang <i>et al.</i> , 1990
Ratón y/o colágeno de tipo I	Ripe <i>et al.</i> , 1989
Proteínas regulada por glucosa (GRP94 and GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
Hormona de crecimiento de rata	Larsen <i>et al.</i> , 1986
Amiloide suero humano A (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
Troponina I (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
Plaquetas derivadas de factor de crecimiento (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
Distrofia muscular de Duchenne	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
Polioma	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
Retroviruses	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Chol <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
Papilloma Virus	Campo <i>et al.</i> , 1983; Luský <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Luský <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987; Glue <i>et al.</i> , 1988
Hepatitis B Virus	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
Virus de la Inmunodeficiencia Humana	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
Citomegalovirus (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foeking <i>et al.</i> , 1986
Gibbon Ape Virus de la Leucemia	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

50

55

60

65

TABLA 4 Elementos inducibles		
Elemento	Inductor	Referencias
MT II	Éster de forbol (TFA) Metales pesados	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeill <i>et al.</i> , 1989
MMTV (virus de tumor mamario de ratón)	Glucocorticoides	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
β-Interferón	poli(r) x poli(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
Adenovirus 5 E2	EIA	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
Colagenasa	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
Estromelisinina	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
Gen MX murino	Interferón, Virus de la enfermedad de Newcastle	Hug <i>et al.</i> , 1988
Gen GRP78	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α-2- Macroglobulina	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
Vimentina	Suero	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHC Clase I Gen H-2kb	Interferón	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	EIA, SV40 antígeno T grande	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
Proliferina	Éster de forbol TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
Factor de Necrosis Tumoral	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
Hormona estimulante del tiroides un gen	Hormona tiroidea	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

La identidad de promotores o elementos específicos de tejido, además de ensayos para caracterizar su actividad, es muy conocida para aquellos expertos en la materia. Ejemplos no limitantes de tales regiones incluyen el gen LIMK2 humano (Nomoto y col., 1999), el gen del receptor 2 de somatostatina (Kraus y col., 1998), el gen de unión a ácido retinoico epididimal murino (Lareyre y col., 1999), CD4 humano (Zhao-Emonet y col., 1998), colágeno alfa2 de ratón (XI) (Tsumaki, y col., 1998), gen receptor de dopamina D1A (Lee, y col., 1997), factor de crecimiento similar a la insulina II (Wu y col., 1997) y molécula 1 de adhesión de células endoteliales a plaquetas humanas (Almendro y col., 1996).

2. Señales de iniciación y sitios de unión a ribosoma internos

También puede requerirse una señal de iniciación específica para la eficaz traducción de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede que se necesite proporcionar señales de control de la traducción exógenas, que incluyen el codón de iniciación ATG. Un experto habitual en la materia podría determinar fácilmente esto y proporcionar las señales necesarias. Es muy conocido que el codón de iniciación debe estar "en marco" con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la

traducción del inserto completo. Las señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser tanto naturales como sintéticas. La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

5 En ciertas realizaciones de la invención, el uso de elementos de sitios de entrada al ribosoma internos (IRES) se usa para crear mensajes multigénicos, o policistrónicos. Los elementos de IRES pueden evitar el modelo de barrido de ribosomas de la traducción dependiente de Cap metilada en 5' y empezar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos de IRES de dos miembros de la familia de picornavirus (poliomielitis y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), además de un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos de IRES pueden ligarse a marcos de lectura abiertos heterólogos. Múltiples marcos de lectura abiertos pueden transcribirse juntos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento de IRES, cada marco de lectura abierto está accesible a ribosomas para la eficaz traducción. Los múltiples genes pueden expresarse eficazmente usando un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.925.565 y 5.935.819).

3. Sitios de clonación múltiple

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácidos nucleicos que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de las cuales puede usarse conjuntamente con tecnología recombinante convencional para digerir el vector (véase, por ejemplo, Carbonelli y col., 1999, Levenson y col., 1998, y Cocea, 1997). "Digestión con enzima de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solo en localizaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están comercialmente disponibles. El uso de tales enzimas es ampliamente entendido por aquellos expertos en la materia. Frecuentemente, un vector se linealiza o fragmenta usando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que secuencias exógenas se ligen al vector. "Ligación" se refiere al procedimiento de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o pueden no ser contiguos entre sí. Las técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligación son muy conocidas para aquellos expertos en la materia de la tecnología recombinante.

4. Sitios de corte y empalme

La mayoría de las moléculas de ARN eucariotas transcritas experimentarán corte y empalme de ARN para eliminar intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucariotas genómicas pueden requerir sitios de corte y empalme donantes y/o aceptores para garantizar el apropiado procesamiento del transcrito para la expresión de proteínas (véase, por ejemplo, Chandler y col., 1997)

5. Señales de terminación

Los vectores o construcciones de la presente invención generalmente comprenderán al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" comprende las secuencias de ADN que participan en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. Así, en ciertas realizaciones se contempla una señal de terminación que termina la producción de un transcrito de ARN. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para lograr niveles de mensaje deseables.

45 En sistemas eucariotas, la región terminadora también puede comprender secuencias de ADN específicas que permiten la escisión específica de sitio del nuevo transcrito de manera que exponga un sitio de poliadenilación. Esto señala una polimerasa endógena especializada para añadir un estiramiento de aproximadamente 200 residuos de A (poliA) al extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola de poliA parecen ser más estables y se traducen más eficazmente. Así, en otras realizaciones que implican eucariotas, se prefiere que el terminador comprenda una señal para la escisión del ARN, y es más preferido que la señal terminadora promueva la poliadenilación del mensaje. Los elementos terminadores y/o de sitios de poliadenilación pueden servir para potenciar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura a través del casete en otras secuencias.

Los terminadores contemplados para su uso en la invención incluyen cualquier terminador conocido de la transcripción descrita en el presente documento o conocida para un experto habitual en la materia, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes tales como, por ejemplo, el terminador de la hormona de crecimiento bovina o secuencias de terminación virales, tales como, por ejemplo, el terminador SV40. En ciertas realizaciones, la señal de terminación puede ser una falta de secuencia transcribible o traducible, tal como debido a una truncación de secuencias.

6. Señales de poliadenilación

En la expresión, particularmente expresión eucariota, normalmente se incluirá una señal de poliadenilación para efectuar la apropiada poliadenilación del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la satisfactoria práctica de la invención, y puede emplearse cualquier secuencia tal. Realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento

bovina, conveniente y conocida por funcionar bien en diversas células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplásmico.

7. Orígenes de replicación

Con el fin de propagar un vector en una célula huésped, puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (frecuentemente llamados "ori"), que es una secuencia de ácidos nucleicos específica en la que se inicia la replicación. Alternativamente puede emplearse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula huésped es levadura.

8. Marcadores de selección y de exploración

En ciertas realizaciones de la invención, células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Tales marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo la fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador de selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador de selección negativo es uno en el que su presencia previene su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

Normalmente, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores de selección útiles. Además de marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes basándose en la implementación de condiciones también se contemplan otros tipos de marcadores que incluyen marcadores de exploración tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Alternativamente, pueden utilizarse enzimas de exploración tales como la timidina cinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con el análisis de FACS. No se cree que el marcador usado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Otros ejemplos de marcadores de selección y de exploración son bien conocidos para un experto en la materia.

9. Vectores plasmídicos

En ciertas realizaciones se contempla un vector plasmídico para su uso para transformar una célula huésped. En general, los vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicación y de control que se derivan de especies compatibles con la células huésped se usan junto con estos huéspedes. El vector habitualmente lleva un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas. En un ejemplo no limitante, *E. coli* se transforma frecuentemente usando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y así proporciona un medio fácil para identificar células transformadas. El plásmido pBR, u otro plásmido microbiano o fago, también debe contener, o modificarse para contener, por ejemplo, promotores que puedan usarse por el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.

Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicación y de control que son compatibles con el microorganismo huésped pueden usarse como vectores de transformación junto con estos huéspedes. Por ejemplo, el fago lambda GEMTMλ11 puede utilizarse para preparar un vector de fago recombinante que puede usarse para transformar células huésped, tales como, por ejemplo, LE392 de *E. coli*.

Otros vectores plasmídicos útiles incluyen vectores pIN (Inouye y col., 1985); y vectores pGEX para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión S-transferasa (GST) para su posterior purificación y separación o escisión. Otras proteínas de fusión adecuadas son aquellas con β-galactosidasa, ubiquitina y similares.

Las células huésped bacterianas, por ejemplo, *E. coli*, que comprenden el vector de expresión se cultivan en cualquier de distintos medios adecuados, por ejemplo, LB. La expresión de la proteína recombinante en ciertos vectores puede inducirse, como se entendería por aquellos expertos en la materia, poniendo en contacto una célula huésped con un agente específico para ciertos promotores, por ejemplo, añadiendo IPTG al medio o cambiando la incubación a una temperatura superior. Después de cultivar las bacterias durante un periodo adicional, generalmente entre 2 y 24 horas, las células se recogen por centrifugación y se lavan para retirar el medio residual.

10. Vectores virales

La capacidad de ciertos virus para infectar células o entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor, y de integrarse en el genoma de células huésped y expresar genes virales establemente y eficazmente, los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños en células (por ejemplo, células de mamífero). Los componentes de vacuna de la presente invención pueden ser un vector viral que codifica una o más

composiciones antigénicas de variantes de proteína de unión a folato u otros componentes tales como, por ejemplo, un inmunomodulador o adyuvante de la variante de proteína de unión a folato. Ejemplos no limitantes de vectores de virus que pueden usarse para administrar un ácido nucleico de la presente invención se describen a continuación.

5 a. Vectores adenovirales

Un procedimiento particular para la administración del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se sabe que los vectores de adenovirus tienen una baja capacidad de integración en el ADN genómico, esta característica se compensa por la alta eficacia de transferencia de genes producida por estos
10 vectores. "Vector de expresión de adenovirus" se entiende que incluye aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el encapsidación de la construcción y (b) finalmente expresar una construcción específica de tejido o célula que se haya clonado en el mismo. El conocimiento de la organización genética o adenovirus, un virus de ADN bicatenario lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes trozos de ADN adenoviral con secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992).

15 b. Vectores AAV

El ácido nucleico puede introducirse en la célula usando transfección asistida por adenovirus. Se ha informado de elevadas eficiencias de transfección en sistemas de células usando sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher y Vos, 1994; Cotten y col., 1992; Curiel, 1994). El virus adenoasociado (AAV) es un sistema de vector atractivo para su uso en las vacunas de variante de proteína de unión a folato de la presente invención ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células que no están en división, haciéndolos de este modo útiles para la administración de genes en células de mamífero, por ejemplo, en cultivo de tejido (Muzyczka, 1992) o *in vivo*. El AAV tiene un amplio espectro de huésped para infectividad (Tratschin y col., 1984; Laughlin y col., 1986; Lebkowski y col., 1988; McLaughlin y col., 1988). Se describen detalles con respecto a la generación y uso de vectores rAAV en las patentes de Estados Unidos nº 5.139.941 y 4.797.368.

25 c. Vectores retrovirales

30 Los retrovirus son prometedores como vectores de administración de antígeno de la variante de proteína de unión a folato en vacunas debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma huésped, transfiriendo una gran cantidad de material genético extraño, infectando un amplio espectro de especies y tipos de células y encapsidándose en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

35 Con el fin de construir un vector retroviral de la vacuna de variante de proteína de unión a folato, un ácido nucleico (por ejemplo, uno que codifica un antígeno de la variante de proteína de unión a folato de interés) se inserta en el genoma viral en el sitio de ciertas secuencias virales para producir un virus que sea deficiente en la replicación. Con el fin de producir viriones, se construye una línea celular de encapsidación que contenga los genes *gag*, *pol* y *env* pero sin las LTR y componentes de encapsidación (Mann y col., 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retroviral y las secuencias de encapsidación, se introduce en una línea celular especial (por ejemplo, por precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo), la secuencia de encapsidación permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se encapside en partículas virales, que después se secretan en el medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann y col., 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge después, opcionalmente se concentra y se usa para la transferencia de genes. Los
45 vectores retrovirales son capaces de infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células huésped (Paskind y col., 1975).

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes *gag*, *pol* y *env*, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Naldini y col., 1996; Zufferey y col., 1997; Blomer y col., 1997; patentes de EE.UU. nº 6.013.516 y 5.994.136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia simia: VIS. Los vectores lentivirales se han generado atenuando múltiplemente los genes de la virulencia del VIH, por ejemplo, los genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* se deletan haciendo el vector biológicamente
55 seguro.

Los vectores lentivirales recombinantes pueden infectar células que no están en división y pueden usarse para la transferencia de genes tanto *in vivo* como *ex vivo* y expresión de secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, lentivirus recombinantes que pueden infectar una célula que no está en división en la que una célula huésped adecuada se transfecta con dos o más vectores que llevan las funciones de encapsidación, concretamente *gag*, *pol* y *env*, además de *rev* y *tat*, se describen en la patente de EE.UU. nº 5.994.136. Puede elegirse como diana el virus recombinante por enlace de la proteína de la envuelta con un anticuerpo o un ligando particular para dirigirse a un receptor de un tipo de célula particular. Insertando de una secuencia (que incluye una región reguladora) de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor sobre una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico para diana.
60
65

d. Otros vectores virales

Pueden emplearse otros vectores virales como construcciones de vacuna en la presente invención. Pueden emplearse vectores derivados de virus tales como virus de la variolovacuna (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988), virus Sindbis, citomegalovirus y virus del herpes simple. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988; Horwich y col., 1990).

e. Administración de vacuna usando virus modificados

Un ácido nucleico que va a administrarse puede alojarse dentro de un virus infeccioso que se ha manipulado para expresar un ligando de unión específica. La partícula de virus se unirá de este modo específicamente a los receptores afines de la célula diana y administrará el contenido a la célula. Recientemente se desarrolló un nuevo enfoque para permitir la elección de diana específica de vectores de retrovirus basándose en la modificación química de un retrovirus por la adición química de residuos de lactosa a la envuelta viral. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos por receptores de sialoglicoproteína.

Se diseñó otro enfoque para elegir como diana los retrovirus recombinantes en el que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de envuelta retroviral y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux y col., 1989). Usando anticuerpos contra antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y de clase II demostraron la infección de una variedad de células humanas que alojaban aquellos antígenos de superficie con un virus ectotrópico *in vitro* (Roux y col., 1989). Así, se contempla que anticuerpos, ligandos de unión específica y/u otros restos que eligen diana puedan usarse para transfectar específicamente tipos de APC.

11. Administración de vector y transformación celular

Se cree que procedimientos adecuados para la administración de ácidos nucleicos para la transformación de un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo para su uso con la presente invención incluyen prácticamente cualquier procedimiento por el que un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) pueda introducirse en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como sería conocido por un experto habitual en la materia. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, administración directa de ADN tal como mediante inyección (patentes de EE.UU. n° 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), que incluye microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; patente de EE.UU. n° 5.789.215); por electroporación (patente de EE.UU. n° 5.384.253; Tur-Kaspa y col., 1986; Potter y col., 1984); por precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991) y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); por bombardeo con microproyectiles (solicitudes PCT n° WO 94/09699 y 95/06128; patentes de EE.UU. n° 5.610.042; 5.322.783; 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppler y col., 1990; patentes de EE.UU. n° 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de EE.UU. n° 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993; patentes de EE.UU. n° 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus y col., 1985), y cualquier combinación de tales procedimientos. Mediante la aplicación de técnicas tales como estas, orgánulos(s), célula(s), tejido(s) u organismo(s) pueden transformarse establemente o transitoriamente.

a. Inyección

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico puede administrarse a un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo mediante una o más inyecciones (es decir, una inyección con aguja). Los procedimientos de inyección de ácidos nucleicos se describen en el presente documento, y son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Otras realizaciones de la presente invención incluyen la introducción de un ácido nucleico por microinyección directa a una célula. La microinyección directa se ha usado para introducir construcciones de ácidos nucleicos en ovocitos de *Xenopus* (Harland y Weintraub, 1985). La cantidad de variante de proteína de unión a folato usada puede variar según la naturaleza del antígeno, además del orgánulo, célula, tejido u organismo usado.

b. Electroporación

En ciertas realizaciones de la presente invención, un ácido nucleico se introduce en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo mediante electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga de alto voltaje eléctrico. En algunas variantes de este procedimiento, ciertas enzimas de degradación de la pared celular, tales como enzimas de degradación de pectina, se emplean para hacer las células receptoras diana más susceptibles a la transformación por electroporación que las células sin tratar (patente de EE.UU. n° 5.384.253). Alternativamente, las células receptoras pueden hacerse más susceptibles a la transformación por enrollado mecánico.

La transfección de células eucariotas usando electroporación ha sido bastante exitosa. Se han transfectado linfocitos pre-B de ratón con genes de inmunoglobulina kappa humana (Potter y col., 1984), y se han transfectado hepatocitos de rata con el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (Tur-Kaspa y col., 1986) de esta manera.

5 Para efectuar la transformación por electroporación en células tales como, por ejemplo, células vegetales, puede emplearse tanto tejidos friables, tales como un cultivo en suspensión de células o callo embriogénico, como
 10 alternativamente pueden transformarse embriones inmaduros u otro tejido organizado directamente. En esta técnica se degradarían parcialmente las paredes celulares de las células elegidas exponiéndolas a enzimas de degradación de pectina (pectoliasas) o enrollando mecánicamente de una manera controlada. Ejemplos de algunas especies que han sido transformadas por electroporación de células intactas incluyen maíz (patente de EE.UU. n° 5.384.253; Rhodes y col., 1995; D'Halluin y col., 1992), trigo (Zhou y col., 1993), tomate (Hou y Lin, 1996), soja (Christou y col., 1987) y tabaco (Lee y col., 1989).

15 También pueden emplearse protoplastos para la transformación por electroporación de células vegetales (Bates, 1994; Lazzeri, 1995). Por ejemplo, la generación de plantas de soja transgénica por electroporación de protoplastos derivados de cotiledones se describe por Dhir y Widholm en la solicitud de patente internacional n° WO 9217598. Otros ejemplos de especies para las que se ha descrito la transformación de protoplastos incluyen cebada (Lazzeri, 1995), sorgo (Batraw y col., 1991), maíz (Bhattacharjee y col., 1997), trigo (He y col., 1994) y tomate (Tsukada, 1989).

20 **c. Fosfato cálcico**

En otras realizaciones de la presente invención, un ácido nucleico se introduce en las células usando precipitación con fosfato cálcico. Se han transfectado células KB humanas con ADN de adenovirus 5 (Graham y Van Der Eb, 1973) usando esta técnica. También de esta manera se transfectaron células L(A9) de ratón, C127, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa de ratón con un gen marcador de neomicina (Chen y Okayama, 1987), y se transfectaron hepatocitos de rata con una variedad de genes marcadores (Rippe y col., 1990).

30 **d. DEAE-dextrano**

En otra realización, una construcción de ácido nucleico se administra a una célula usando DEAE-dextrano seguido por polietilenglicol. De esta manera se introdujeron plásmidos indicadores en células de mieloma y eritroleucemia de ratón (Gopal, 1985).

35 **e. Transfección mediada por liposomas**

En otra realización de la invención, uno o más componentes de vacuna o ácidos nucleicos pueden ser atrapados en un complejo de lípido tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de fosfolípido y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples
 40 capas de lípidos separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de disolución acuosa. Los componentes de lípidos experimentan transposición propia antes de la formación de estructura cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas de lípidos (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contempla un ácido nucleico complejado con lipofectamina (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

45 La administración de ácidos nucleicos mediada por liposomas y la expresión de ADN extraño *in vitro* ha sido muy satisfactoria (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987). También se ha demostrado la viabilidad de la administración mediada por liposomas y la expresión de ADN extraño en células de embrión de pollo cultivadas, HeLa y hepatoma (Wong y col., 1980).

50 En ciertas realizaciones de la invención, un liposoma puede complejarse con un virus hemaglutinante (HVJ). Se ha mostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada celular de ADN encapsulado por liposomas (Kaneda y col., 1989). En otras realizaciones, un liposoma puede complejarse o emplearse conjuntamente con proteínas cromosómicas no histónicas nucleares (HMG-1) (Kato y col., 1991). En todavía otras realizaciones, un liposoma puede complejarse o emplearse conjuntamente con tanto HVJ como HMG-1. En otras realizaciones, un vehículo de administración puede comprender un ligando y un liposoma.

55 **f. Transfección mediada por receptor**

60 Pueden emplearse uno o más componentes de vacuna o ácidos nucleicos para ser administrados usando un vehículo de administración mediado por receptor. Estos tienen la ventaja de la captación selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por un receptor, que sucederá en las células diana. En vista de la distribución específica del tipo de célula de diversos receptores, este procedimiento de administración añade otro grado de especificidad a la presente invención. Se ha descrito la administración específica en el contexto de otro tipo
 65 de célula de mamífero (Wu y Wu, 1993).

Ciertos vehículos que eligen como diana genes mediados por receptor comprenden un ligando específico de receptor celular y un agente de unión a ácido nucleico. Otros comprenden un ligando específico de receptor celular al que el ácido nucleico que tiene que administrarse se ha unido de forma operativa. Se han usado varios ligandos para la transferencia de genes mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wagner y col., 1990; Perales y col., 1994; Myers, documento EPO 0273085), que establece la operabilidad de la técnica. Se ha descrito la administración específica en el contexto de otro tipo de célula de mamífero (Wu y Wu, 1993). En ciertos aspectos de la presente invención, un ligando se elegirá para corresponderse con un receptor expresado específicamente en la población de células diana.

En otras realizaciones, un componente del vehículo de administración de ácido nucleico de un vehículo que elige como diana ácido nucleico específico de células puede comprender un ligando de unión específica en combinación con un liposoma. El (Los) ácido(s) nucleico(s) a administrar están alojados dentro del liposoma y el ligando de unión específica está funcionalmente incorporado en la membrana del liposoma. El liposoma de este modo se unirá específicamente al (a los) receptor(es) de una célula diana y administrará el contenido a una célula. Se ha mostrado que tales sistemas son funcionales usando sistemas en los que, por ejemplo, se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la administración mediada por receptor de un ácido nucleico a células que muestran regulación por incremento del receptor de EGF.

En todavía otras realizaciones, el componente del vehículo de administración de ácido nucleico de un vehículo de administración dirigida puede ser el propio liposoma, que preferiblemente comprenderá uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen la unión específica de células. Por ejemplo, lactosil-ceramida, un asialogangliósido terminal de galactosa, se ha incorporado en liposomas y se observó un aumento en la captación del gen de la insulina por los hepatocitos (Nicolau y col., 1987). Se contempla que las construcciones transformantes específicas del tejido de la presente invención pueden administrarse específicamente a una célula diana de una manera similar.

g. Bombardeo con microproyectiles

Las técnicas de bombardeo con microproyectiles pueden usarse para introducir un ácido nucleico en al menos un orgánulo, célula, tejido u organismo (patente de EE.UU. n° 5.550.318; patente de EE.UU. n° 5.538.880; patente de EE.UU. n° 5.610.042; y solicitud PCT WO 94/09699). Este procedimiento depende de la capacidad para acelerar microproyectiles recubiertos de ADN a una velocidad muy alta que les permite perforar membranas celulares y entrar en las células sin destruirlas (Klein y col., 1987). Se conoce una amplia variedad de técnicas de bombardeo con microproyectiles en la técnica, muchas de las cuales son aplicables a la invención.

El bombardeo con microproyectiles puede usarse para transformar diversas células, tejidos u organismos tales como, por ejemplo, cualquier especie de planta. Ejemplos de especies que han sido transformadas por bombardeo con microproyectiles incluyen especies monocotiledóneas tales como maíz (solicitud PCT WO 95/06128), cebada (Ritala y col., 1994; Hensgens y col., 1993), trigo (patente de EE.UU. n° 5.563.055), arroz (Hensgens y col., 1993), avena (Torbet y col., 1995; Torbet y col., 1998), centeno (Hensgens y col., 1993), caña de azúcar (Bowery col., 1992) y sorgo (Casas y col., 1993; Hagio y col., 1991); además de varias dicotiledóneas que incluyen tabaco (Tomes y col., 1990; Busing y Benbow, 1994), soja (patente de EE.UU. n° 5.322.783), girasol (Knittel y col. 1994), cacahuete (Singsit y col., 1997), algodón (McCabe y Martinell, 1993), tomate (VanEck y col. 1995) y legumbres en general (patente de EE.UU. n° 5.563.055).

En este bombardeo con microproyectiles, una o más partículas pueden recubrirse con al menos un ácido nucleico y administrarse a células por una fuerza impulsora. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Un dispositivo tal se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motora (Yang y col., 1990). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como tungsteno o partículas de oro o perlas. Partículas a modo de ejemplo incluyen aquellas que comprenden tungsteno, platino, y preferentemente, oro. Se contempla que en algunos casos la precipitación de ADN sobre partículas metálicas no sería necesaria para la administración de ADN a una célula receptora usando bombardeo con microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas pueden contener ADN en vez de recubrirse con ADN. Las partículas recubiertas de ADN puede aumentar el nivel de administración de ADN mediante bombardeo de partículas pero no son, de por sí, necesarias.

Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran sobre filtros o medio de cultivo sólido. Alternativamente, embriones inmaduros u otras células diana pueden disponerse sobre medio de cultivo sólido. Las células que van a bombardearse están posicionadas a una distancia apropiada por debajo de la placa de parada de los macroproyectiles.

12. Células huésped

Como se usa en el presente documento, los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden usarse indistintamente. Todos estos términos también incluyen su progenie, que es toda y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. En el contexto de expresar una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga, "célula huésped" se refiere

a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que pueda replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula huésped puede usarse, y se ha usado, como un receptor para vectores. Una célula huésped puede “transfectarse” o “transformarse”, que se refiere a un procedimiento por el que ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en la célula huésped. Una célula transformada incluye la célula objeto primaria y su progenie. Como se usa en el presente documento, los términos células o células huésped “manipuladas” y “recombinantes” pretenden referirse a una célula en la que se ha introducido una secuencia de ácidos nucleicos exógena, tal como, por ejemplo, un vector. Por tanto, las células recombinantes pueden distinguirse de células que se producen naturalmente que no contienen un ácido nucleico recombinantemente introducido.

En ciertas realizaciones se contempla que ARN o secuencias proteínicas puedan co-expresarse con otros ARN seleccionados o secuencias proteínicas en la misma célula huésped. La co-expresión puede lograrse co-transfectando la célula huésped con dos o más vectores recombinantes distintos. Alternativamente, puede construirse un único vector recombinante que incluye múltiples regiones codificantes distintas para ARN, que entonces podrían expresarse en células huésped transfectadas con el único vector.

Un tejido puede comprender una célula huésped o células que van a transformarse con una variante de proteína de unión a folato. El tejido puede ser parte o separarse de un organismo. En ciertas realizaciones, un tejido puede comprender, pero no se limita a, adipocitos, alveolar, ameloblastos, axón, células basales, sangre (por ejemplo, linfocitos), vaso sanguíneo, hueso, médula ósea, cerebro, mama, cartílago, cuello uterino, colon, córnea, embrionario, endometrio, endotelial, epitelial, esófago, fascia, fibroblasto, folicular, células ganglionares, células de la glía, células calcificantes, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, músculo, neurona, ovario, páncreas, sangre periférica, próstata, piel, piel, intestino delgado, bazo, citoblastos, estómago, testículos, anteras, tejido ascítico, mazorcas, mazorcas, flores, cáscaras, granos, hojas, células meristemáticas, polen, puntas de la raíz, raíces, seda, tallos y todos los cánceres de los mismos.

En ciertas realizaciones, la célula huésped o tejido puede estar comprendida en al menos un organismo. En ciertas realizaciones, el organismo puede ser, pero no se limita a, un procariota (por ejemplo, una eubacteria, una arquea) o un eucariota, como se entendería por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, la página web <http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>).

Están disponibles numerosas líneas celulares y cultivos para su uso como una célula huésped, y pueden obtenerse mediante la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que es una organización que sirve de archivo para cultivos vivos y materiales genéticos (www.atcc.org). Un huésped apropiado puede determinarse por un experto en la materia basándose en el esqueleto del vector y el resultado deseado. Un plásmido o cósmido, por ejemplo, puede introducirse en una célula huésped procariota para la replicación de muchos vectores. Tipos de células disponibles para la replicación y/o expresión de vectores incluyen, pero no se limitan a, bacterias tales como *E. coli* (por ejemplo, cepa RR1 de *E. coli*, LE392 de *E. coli*, B de *E. coli*, X 1776 de *E. coli* (ATCC nº 31537), además de W3110 de *E. coli* (F', lambda, prototrófico, ATCC nº 273325), bacilos tales como *Bacillus subtilis*; y otras enterobacteriaceae tales como *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, diversas especies de *Pseudomonas*, DH5a, JM109 y KC8, además de varios huéspedes bacterianos comercialmente disponibles tales como células competentes SURE® y células SOLOPACK™ Gold (STRATAGENE®, La Jolla). En ciertas realizaciones, células bacterianas tales como LE392 de *E. coli* se contemplan particularmente como células huésped para virus de fago.

Ejemplos de células huésped eucariotas para la replicación y/o expresión de un vector incluyen, pero no se limitan a, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos y PC12. Están disponibles muchas células huésped de diversos tipos de células y organismos y serían conocidas para un experto en la materia. Similarmente, un vector viral puede usarse conjuntamente con tanto una célula huésped eucariota como procariota, particularmente una que es permisiva para la replicación o expresión del vector.

Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que permiten que se repliquen y/o expresen en tanto en células procariotas como eucariotas. Un experto en la materia entendería adicionalmente las condiciones bajo las que incubar todas las células huésped anteriormente descritas para mantenerlas y para permitir la replicación de un vector. También se entienden y conocen técnicas y condiciones que permitirían la producción a gran escala de vectores, además de la producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos relacionados, proteínas o péptidos.

13. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte o todas las composiciones tratadas anteriormente. Pueden emplearse sistemas basados en procariotas y/o eucariotas para su uso con la presente invención para producir secuencias de ácidos nucleicos, o sus polipéptidos, proteínas y péptidos relacionados. Muchos de tales sistemas están comercialmente y ampliamente disponibles.

El sistema de célula de insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión de proteínas de un segmento heterólogo de ácido nucleico, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.871.986, 4.879.236, y que puede

comprarse, por ejemplo, bajo el nombre MAXBAC® 2.0 de INVITROGEN® y sistema de expresión de baculovirus BACPACK™ de CLONTECH®.

Otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen sistema de expresión en mamífero inducible STRATAGENE®'s COMPLETE CONTROL™ que implica un receptor inducible de ecdisona sintético, o su sistema de expresión pET, un sistema de expresión en *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible de INVITROGEN®, que lleva el sistema T-REX™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión inducible de mamífero que usa el promotor de longitud completa del CMV. INVITROGEN® también proporciona un sistema de expresión en levadura llamado el sistema de expresión en *Pichia methanolica*, que se diseña para la producción de alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un experto en la materia sabría cómo expresar un vector, tal como una construcción de expresión, para producir una secuencia de ácidos nucleicos o su polipéptido, proteína o péptido relacionado.

Se contempla que las proteínas, polipéptidos o péptidos producidos mediante los procedimientos de la invención pueden “expresarse en exceso”, es decir, expresarse en niveles elevados con respecto a su expresión natural en células. Tal expresión en exceso puede evaluarse mediante una variedad de procedimientos, que incluyen radiomarcado y/o purificación de proteínas. Sin embargo, se prefieren procedimientos simples y directos, por ejemplo, aquellos que implican SDS/PAGE y tinción de proteínas o transferencia Western, seguido de análisis cuantitativos tales como barrido densitométrico del gel resultante o transferencia. Un aumento específico en el nivel de la proteína recombinante, polipéptido o péptido en comparación con el nivel en células naturales es indicativo de expresión en exceso, ya que es una abundancia relativa de la proteína, polipéptidos o péptidos específicos en relación con las otras proteínas producidas por la célula huésped y, por ejemplo, visible sobre un gel.

En algunas realizaciones, la secuencia proteínica expresada forma un cuerpo de inclusión en la célula huésped, las células huésped se lisan, por ejemplo, por rotura en un homogeneizador de células, se lavan y/o centrifugan para separar los cuerpos de inclusión densos y membranas celulares de los componentes celulares solubles. Esta centrifugación puede realizarse en condiciones por las que los cuerpos de inclusión densos se enriquecen selectivamente por incorporación de azúcares, tales como sacarosa, en el tampón y centrifugación a una velocidad selectiva. Los cuerpos de inclusión pueden solubilizarse en disoluciones que contienen altas concentraciones de urea (por ejemplo, 8M) o agentes caotrópicos tales como clorhidrato de guanidina en presencia de agentes reductores, tales como β-mercaptoetanol o DTT (ditiotretol), y replegarse en una conformación más deseable, como se conocería para un experto habitual en la materia.

G. Purificación de componentes de vacuna

En cualquier caso, un componente de vacuna (por ejemplo, un péptido antigénico o polipéptido o ácido nucleico que codifica una composición proteínica) puede aislarse y/o purificarse de los reactivos de síntesis química, célula o componentes celulares. En un procedimiento de producción del componente de vacuna, la purificación se lleva a cabo por cualquier técnica apropiada que se describe en el presente documento o muy conocida para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, Sambrook y col., 1987). Aunque se prefiere para su uso en ciertas realizaciones, no hay requisito general de que una composición antigénica de la presente invención u otro componente de vacuna se proporcione siempre en su estado más purificado. De hecho, se contempla que un componente de vacuna sustancialmente menos purificado, que sin embargo está enriquecido en el compuesto deseado, con respecto al estado natural, tenga utilidad en ciertas realizaciones, tales como, por ejemplo, recuperación total del producto de proteína, o en mantener la actividad de una proteína expresada. Sin embargo, se contempla que los productos inactivos también tengan utilidad en ciertas realizaciones, tales como, por ejemplo, en determinar la antigenicidad mediante la generación de anticuerpos.

La presente invención también proporciona vacunas o componentes de vacuna purificados, y en realizaciones preferidas, sustancialmente purificados. El término “componente de vacuna purificado”, como se usa en el presente documento, pretende referirse a al menos un componente de vacuna (por ejemplo, una composición proteínica, aislable de células), en el que el componente se purifica a cualquier grado con respecto a su estado naturalmente obtenible, por ejemplo, con respecto a su pureza dentro de un extracto celular o reactivos de síntesis química. En ciertos aspectos en los que el componente de vacuna es una composición proteínica, un componente de vacuna purificado también se refiere a una proteína natural o mutante, polipéptido, o péptido libre del entorno en el que se produce naturalmente.

Si se usa el término “sustancialmente purificado”, esto se referirá a una composición en la que el compuesto específico (por ejemplo, una proteína, polipéptido o péptido) forma el principal componente de la composición, tal como que constituye aproximadamente el 50 % de los compuestos en la composición o más. En realizaciones preferidas, un componente de vacuna sustancialmente purificado constituirá más de aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 99 % o incluso más de los compuestos en la composición.

En ciertas realizaciones, un componente de vacuna puede purificarse a homogeneidad. Como se aplica a la presente invención, “purificado a homogeneidad” significa que el componente de vacuna tiene un nivel de pureza en

el que el compuesto está sustancialmente libre de otros productos químicos, biomoléculas o células. Por ejemplo, un péptido purificado, polipéptido o proteína estará frecuentemente suficientemente libre de otros componentes de proteína de manera que pueda realizarse satisfactoriamente secuenciación degradativa. Diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación de un componente de vacuna serán conocidos para aquellos expertos en la materia en vista de la presente divulgación. Éstos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad de proteínas específica de una fracción (por ejemplo, antigenicidad), o evaluar el número de polipéptidos dentro de una fracción por electroforesis en gel.

Diversas técnicas adecuadas para su uso en purificación química, de biomoléculas o biológica, muy conocidas para aquellos expertos en la materia, pueden aplicarse a la preparación de un componente de vacuna de la presente invención. Éstas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o por desnaturalización térmica, seguido por centrifugación; fraccionamiento, procedimientos cromatográficos, que incluyen, pero no se limitan a, cromatógrafo de reparto (por ejemplo, cromatógrafo en papel, cromatógrafo de capa fina (CCF), cromatografía de gases-líquidos y cromatografía en gel), cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de afinidad, cromatografía de flujo supercrítico, intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, hidroxilapatita, afinidad por lectina; isoelectroenfoque y electroforesis en gel (véase, por ejemplo, Sambrook y col. 1989; y Freifelder, *Physical Biochemistry*, segunda edición, páginas 238-246).

Dado que muchos ADN y proteínas son conocidos (véanse, por ejemplo, las bases de datos Genbank y GenPept del Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)), o pueden identificarse y amplificarse usando los procedimientos descritos en el presente documento, ahora puede emplearse cualquier procedimiento de purificación para secuencias de ácidos nucleicos o proteináceas recombinantemente expresadas conocidos para aquellos expertos en la materia. En ciertos aspectos, un ácido nucleico puede purificarse sobre geles de poli(acrilamida), y/o gradientes de centrifugación en cloruro de cesio, o por cualquier otro medio conocido para un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col. 1989). En otros aspectos, una purificación de una secuencia proteinácea puede realizarse expresando recombinantemente la secuencia como una proteína de fusión. Tales procedimientos de purificación son rutinarios en la materia. Esto se ejemplifica por la generación de una proteína de fusión de proteína-glutación S-transferasa específica, expresión en *E. coli* y aislamiento a homogeneidad usando cromatografía de afinidad sobre glutación-agarosa o la generación de una marca de polihistidina sobre el extremo N o C de la proteína, y posterior purificación usando cromatografía de afinidad en Ni. En aspectos particulares, células u otros componentes de la vacuna pueden purificarse por citometría de flujo. La citometría de flujo implica la separación de células u otras partículas en una muestra líquida, y es muy conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 3.826.364, 4.284.412, 4.989.977, 4.498.766, 5.478.722, 4.857.451, 4.774.189, 4.767.206, 4.714.682, 5.160.974 y 4.661.913). Cualquiera de estas técnicas descritas en el presente documento, y combinaciones de éstas y cualquier otra técnica conocida para expertos en la materia, puede usarse para purificar y/o ensayar la pureza de los diversos productos químicos, compuestos proteináceos, ácidos nucleicos, materiales celulares y/o células que pueden comprender una vacuna de la presente invención. Como se conoce generalmente en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación puede cambiarse, o que ciertas etapas pueden omitirse, y todavía producir un procedimiento adecuado para la preparación de un antígeno sustancialmente purificado u otro componente de vacuna.

H. Componentes de vacuna adicionales

Se contempla que una composición antigénica de la invención puede combinarse con uno o más componentes adicionales para formar una vacuna más selectiva. Ejemplos no limitantes de componentes adicionales incluyen, por ejemplo, uno o más antígenos adicionales, inmunomoduladores o adyuvantes para estimular una respuesta inmunitaria a una composición antigénica de la presente invención y/o el (los) componente(s) adicional(es).

I. Inmunomoduladores

Por ejemplo, se contempla que pueden incluirse inmunomoduladores en la vacuna para aumentar la respuesta de una célula o un paciente (por ejemplo, un animal). Los inmunomoduladores pueden incluirse como proteínas purificadas, ácidos nucleicos que codifican inmunomoduladores y/o células que expresan inmunomoduladores en la composición de vacuna. Las siguientes secciones enumeran ejemplos no limitantes de inmunomoduladores que son de interés, y se contempla que diversas combinaciones de inmunomoduladores pueden usarse en ciertas realizaciones (por ejemplo, una citocina y una quimiocina).

En otros aspectos de la invención se contempla que la composición de variante de proteína de unión a folato puede comprender además una composición terapéuticamente eficaz de un inmunomodulador. Se prevé que un inmunomodulador constituiría una citocina, hematopoyetina, factor estimulante de colonias, interleucina, interferón, factor de crecimiento o combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento en ciertas realizaciones, el término "citocina" es el mismo que se describe en la patente de EE.UU. n° 5.851.984, que reza en la parte relevante:

El término 'citocina' es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas, factores de

crecimiento y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas están incluidas hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante tiroidea (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombotopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón-a, -b y -g; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, ligando kit o FLT-3. Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

a. β -interferón

El β -interferón (IFN-b) es una proteína molecular de bajo peso que se produce por muchos tipos de células, que incluyen células epiteliales, fibroblastos y macrófagos. Las células que expresan IFN-b endógeno son resistentes a infección y replicación viral. Los genes β -interferón de ratón (números de acceso de GenBank X14455, X14029) y humano (números de acceso de GenBank J00218, K00616 y M11029) se han aislado y secuenciado. El IFN-b es una glicoproteína multifuncional que puede inhibir el crecimiento tumoral tanto directamente, suprimiendo la replicación celular e induciendo diferenciación o apoptosis, como indirectamente activando propiedades tumorocidas de macrófagos y células NK, suprimiendo la angiogénesis tumoral y estimulando respuesta inmunitaria específica.

b. Interleucina-2

La interleucina-2 (IL-2), originalmente designada factor I de crecimiento de linfocitos T, es un inductor altamente competente de la proliferación de linfocitos T y es un factor de crecimiento para todas las subpoblaciones de linfocitos T. IL-2 es un factor de proliferación independiente de antígeno que induce progresión del ciclo celular en células en reposo y así permite la expansión clónica de linfocitos T activados. Como las células leucémicas recientemente aisladas también secretan IL-2 y responden a ella, la IL-2 puede funcionar como un modulador del crecimiento autocrino para estas células que pueden empeorar ATL. La IL-2 también promueve la proliferación de linfocitos B activados, aunque esto requiere la presencia de factores adicionales, por ejemplo, IL-4. La IL-2 *in vitro* también estimula el crecimiento de células oligodendrogiales. Debido a su efecto sobre linfocitos T y linfocitos B, la IL-2 es un regulador central de respuestas inmunitarias. También desempeña una función en reacciones antiinflamatorias, en hematopoyesis y en la supervisión tumoral. La IL-2 estimula la síntesis de IFN-g en leucocitos periféricos y también induce la secreción de IL-1, TNF- α y TNF-b. La inducción de la secreción de citocinas tumorocidas, aparte de la actividad en la expansión de células LAK (células asesinas activadas por linfocinas), son probablemente los principales factores responsables de la actividad antitumoral de IL-2.

c. GM-CSF

El GM-CSF estimula la proliferación y diferenciación de linajes neutrófilos, eosinófilos y monocíticos. También activa funcionalmente las formas maduras correspondientes, potenciando, por ejemplo, la expresión de ciertas proteínas de adhesión de la superficie celular (CD-11A, CD-11C). La expresión en exceso de estas proteínas podría ser una explicación de la acumulación local observada de granulocitos en sitios de inflamación. Además, el GM-CSF también potencia la expresión de receptores para fMLP (formil-Met-Leu-Phe) que es un estimulante de la actividad de neutrófilos.

d. Citocinas

Las interleucinas, citocina, ácidos nucleicos que codifican interleucinas o citocinas, y/o células que expresan tales compuestos se contemplan como posibles componentes de vacuna. Las interleucinas y citocinas incluyen, pero no se limitan a, interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-18, β -interferón, α -interferón, γ -interferón, angiostatina, trombospondina, endostatina, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, METH-1, METH-2, factor de necrosis tumoral, TGFb, LT y combinaciones de las mismas.

e. Quimiocinas

Las quimiocinas, ácidos nucleicos que codifican quimiocinas y/o células que expresan tales también pueden usarse como componentes de vacuna. Las quimiocinas generalmente actúan de quimioatrayentes para reclutar células efectoras inmunitarias al sitio de expresión de quimiocinas. Puede ser ventajoso expresar una secuencia codificante de quimiocinas particular en combinación con, por ejemplo, una secuencia codificante de citocinas, para potenciar el reclutamiento de otros componentes del sistema inmunitario al sitio de tratamiento. Tales quimiocinas incluyen, por

ejemplo, RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-beta, IP-10 y combinaciones de las mismas. El experto reconocerá que ciertas citocinas también son conocidas por tener efectos quimioatrayentes y también podrían clasificarse bajo el término quimiocinas.

5 f. Proteínas transportadoras inmunogénicas

En ciertas realizaciones, una composición antigénica puede acoplarse químicamente a un vehículo o expresarse recombinantemente con un péptido transportador inmunogénico o polipéptido (por ejemplo, un péptido o polipéptido de fusión de antígeno-transportador) para potenciar una reacción inmunitaria. Secuencias de aminoácidos transportadores inmunogénicos a modo de ejemplo y preferidas incluyen antígeno de superficie de la hepatitis B, hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). Otras albúminas tales como albúmina de huevo, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo también pueden usarse como proteínas transportadoras inmunogénicas. Medios para conjugar un polipéptido o péptido con una proteína transportadora inmunogénica son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

g. Modificadores de la respuesta biológica

Puede desearse coadministrar modificadores de la respuesta biológica (BRM), que se ha mostrado que regulan por incremento la inmunidad de linfocitos T o regulan por disminución la actividad de células supresoras. Tales BRM incluyen, pero no se limitan a, cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); ciclofosfamida de baja dosis (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ), o un gen que codifica una proteína que participa en una o más funciones colaboradoras inmunitarias, tales como B-7.

25 2. Adyuvantes

Los protocolos de inmunización han usado adyuvantes para estimular respuestas durante muchos años, y como tales los adyuvantes son muy conocidos para un experto habitual en la materia. Algunos adyuvantes afectan la forma en la que los antígenos se presentan. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria aumenta cuando los antígenos de proteína se precipitan por alumbre. La emulsión de antígenos también prolonga la duración de la presentación de antígeno.

En un aspecto, un efecto adyuvante se logra por el uso de un agente tal como alumbre usado en aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 0,1 % de disolución en solución salina tamponada con fosfato. Alternativamente, el antígeno se prepara como una mezcla con polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol®) usados como disolución a aproximadamente el 0,25 %. El efecto adyuvante también puede hacerse por agregación del antígeno en la vacuna por tratamiento térmico con temperaturas que oscilan entre aproximadamente 70 ° y aproximadamente 101 °C durante un periodo de 30 segundos a 2 minutos, respectivamente. También puede emplearse agregación por reactivación con anticuerpos (Fab) tratados con pepsina para albúmina, mezcla con célula(s) bacteriana(s) tales como *C. parvum* o una endotoxina o componentes de lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas, emulsión en vehículos de aceite fisiológicamente aceptables tales como mono-oleato de manida (Aracel A) o emulsión con una disolución al 20 % de un perfluorocarbono (Fluosol-DA®) usado como sustituto de bloques.

Algunos adyuvantes, por ejemplo, son ciertas moléculas orgánicas obtenidas de bacterias, actúan sobre el huésped en vez de sobre el antígeno. Un ejemplo es muramil dipéptido (N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina [MDP]), un peptidoglicano bacteriano. Los efectos de MDP, al igual que con la mayoría de los adyuvantes, no se entienden completamente. MDP estimula macrófagos, pero también parece estimular linfocitos B directamente. Por tanto, los efectos de los adyuvantes no son específicos de antígeno. Sin embargo, si se administran junto con un antígeno purificado, pueden usarse para promover selectivamente la respuesta al antígeno.

Se han usado adyuvantes experimentalmente para promover un aumento generalizado en la inmunidad contra antígenos desconocidos (por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.877.611). Esto se ha intentado particularmente en el tratamiento de cáncer. Para muchos cánceres hay pruebas convincentes de que el sistema inmunitario participa en la defensa del huésped contra las células tumorales, pero se cree que solo una fracción del número probablemente total de antígenos específicos de tumor se ha identificado hasta la fecha. Sin embargo, usando la presente invención, la inclusión de un adyuvante adecuado en la membrana de una célula tumoral irradiada aumentará probablemente la respuesta antitumoral independientemente de la identificación molecular de los antígenos importantes. Esto es una característica particularmente importante y que ahorra tiempo de la invención.

En ciertas realizaciones, las hemocianinas y hemoeritrinas también pueden usarse en la invención. El uso de hemocianina de lapa californiana (KLH) se prefiere en ciertas realizaciones, aunque pueden emplearse otras hemocianinas y hemoeritrinas de moluscos y artrópodos.

También pueden usarse diversos adyuvantes de polisacárido. Por ejemplo, se ha descrito el uso de diversos adyuvantes de polisacáridos neumocócicos sobre las respuestas de anticuerpos de ratones (Yin y col., 1989). Las dosis que producen respuestas óptimas, o que de otro modo no producen supresión, deben emplearse como se

indica (Yin y col., 1989). Las variedades de poliamina de polisacáridos son particularmente preferidas, tales como quitina y quitosano, que incluyen quitina desacetilada.

5 Otro grupo de adyuvantes son el grupo muramil dipéptido (MDP, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina) de peptidoglicanos bacterianos. También se contemplan derivados de muramil dipéptido, tales como el aminoácido derivado treonil-MDP y el derivado de ácido graso MTPPE.

10 La patente de EE.UU. 4.950.645 describe un derivado de disacárido-tripéptido lipófilo de muramil dipéptido que se describe para su uso en liposomas artificiales formados a partir de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol. Se cree que es eficaz en activar monocitos humanos y destruir células tumorales, pero no es tóxico a dosis generalmente altas. Los compuestos de la patente de EE.UU. 4.950.645 y la solicitud de patente PCT WO 91/16347 se contemplan para su uso con vehículos celulares y otras realizaciones de la presente invención.

15 Otro adyuvante contemplado para su uso en la presente invención es BCG. También pueden usarse BCG (bacilo de Calmette-Guerin, una cepa atenuada de *Mycobacterium*) y el esqueleto de la pared celular de BCG (CWS) como adyuvantes en la invención, con o sin dimicolato de trehalosa. El dimicolato de trehalosa puede usarse por sí mismo. Se ha mostrado que la administración de dimicolato de trehalosa se correlaciona con elevada resistencia a infección por el virus de la gripe en ratones (Azuma y col., 1988). Puede prepararse dimicolato de trehalosa como se describe en la patente de EE.UU. 4.579.945.

20 BCG es una herramienta clínica importante debido a sus propiedades inmunoestimulantes. BCG actúa estimulando el sistema reticuloendotelial, activa linfocitos citolíticos espontáneos y aumenta la proliferación de citoblastos hematopoyéticos. Se ha demostrado que los extractos de la pared celular de BCG tienen excelente actividad de adyuvante inmunitario. Herramientas genéticas moleculares y procedimientos para micobacterias han proporcionado los medios para introducir genes extraños en BCG (Jacobs y col., 1987; Snapper y col., 1988; Husson y col., 1990; Martin y col., 1990).

30 El BCG vivo es una vacuna eficaz y segura usada en el mundo para prevenir la tuberculosis. El BCG y otras micobacterias son adyuvantes altamente eficaces, y la respuesta inmunitaria a las micobacterias se ha estudiado ampliamente. Con casi 2 billones de inmunizaciones, el BCG tiene un largo registro de uso seguro en el hombre (Luelmo, 1982; Lotte y col., 1984). Es una de las pocas vacunas que puede administrarse al nacer, engendra respuestas inmunitarias de larga vida con solo una dosis única, y hay una red de distribución en el mundo con experiencia en la vacunación con BCG. Una vacuna de BCG a modo de ejemplo se comercializa como TICE™ BCG (Organon Inc., West Orange, NJ).

35 En una práctica típica de la presente invención, las células de *Mycobacterium bovis*-BCG se cultivan y se recogen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden cultivarse como una película superficial sobre un medio de Sauton o en un recipiente de fermentación que contiene el cultivo dispersado en un medio de Dubos (Dubos y col., 1947; Rosenthal, 1937). Todos los cultivos se recogen después de 14 días de incubación a aproximadamente 37 °C. Las células cultivadas como una película se recogen usando un bucle de platino mientras que aquellas del fermentador se recogen por centrifugación o filtración de flujo tangencial. Las células recogidas se resuspenden en un medio de tampón estéril acuoso. Una suspensión típica contiene de aproximadamente 2×10^{10} células/ml a aproximadamente 2×10^{12} células/ml. A esta suspensión bacteriana se añade una disolución estéril que contiene una enzima seleccionada que degradará la célula de BCG que cubre el material. La suspensión resultante se agita tal como por agitación para garantizar la máxima dispersión de los organismos de BCG. A partir de aquí se prepara una suspensión de células más concentrada y la enzima en el concentrado se retira, normalmente lavando con un tampón acuoso, empleando técnicas conocidas tales como filtración de flujo tangencial. Las células sin enzima se ajustan a una concentración inmunológica óptima con una disolución crioprotectora, después de lo cual se envasan en viales, ampollas, etc., y se liofilizan dando vacuna de BCG, que tras la reconstitución con agua está lista para inmunización.

50 Agentes tensioactivos y anfipáticos, por ejemplo, saponina y derivados tales como QS21 (Cambridge Biotech), forman todavía otro grupo de adyuvantes para su uso con los inmunógenos de la presente invención. También pueden emplearse tensioactivos de copolímeros de bloque no iónicos (Rabinovich y col., 1994; Hunter y col., 1991). Los oligonucleótidos son otro grupo útil de adyuvantes (Yamamoto y col., 1988). Quil A y lentineno son otros adyuvantes que pueden usarse en ciertas realizaciones de la presente invención.

60 Un grupo de adyuvantes preferidos para su uso en la invención son las endotoxinas desintoxicadas, tales como la endotoxina desintoxicada refinada de la patente de EE.UU. 4.866.034. Estas endotoxinas desintoxicadas refinadas son eficaces en producir respuestas de adyuvantes en mamíferos. Por supuesto, las endotoxinas desintoxicadas pueden combinarse con otros adyuvantes para preparar células incorporadas en múltiples adyuvantes. Por ejemplo, se contempla particularmente la combinación de endotoxinas desintoxicadas con dimicolato de trehalosa, como se describe en la patente de EE.UU. 4.435.386. También se contemplan combinaciones de endotoxinas desintoxicadas con dimicolato de trehalosa y glicolípidos endotóxicos (patente de EE.UU. 4.505.899), ya que es la combinación de endotoxinas desintoxicadas con esqueleto de la pared celular (CWS) o CWS y dimicolato de trehalosa, como se describe en las patentes de EE.UU. 4.436.727, 4.436.728 y 4.505.900. También se prevé que sean útiles las

combinaciones de solo CWS y dimicolato de trehalosa, sin endotoxinas desintoxicadas, como se describe en la patente de EE.UU. 4.520.019.

5 En otras realizaciones, la presente invención contempla que una variedad de adyuvantes pueden emplearse en las membranas de células, produciendo una composición inmunogénica mejorada. El único requisito es, generalmente, que el adyuvante sea capaz de incorporación en, asociación física con, o conjugación con, la membrana celular de la célula en cuestión. Aquellos expertos en la materia conocerán los diferentes tipos de adyuvantes que pueden conjugarse con vacunas celulares según la presente invención y éstos incluyen alquil-lisofosfolípidos (ALP); BCG; y biotina (incluyendo derivados biotinilados), entre otros. Ciertos adyuvantes particularmente contemplados para su uso son los ácidos teicoicos de células Gram-positivas. Éstos incluyen los ácidos lipoteicoicos (LTA), ácidos ribitolteicoicos (RTA) y ácido glicerolteicoico (GTA). También pueden emplearse formas activas de sus homólogos sintéticos a propósito de la invención (Takada y col., 1995a).

15 Diversos adyuvantes, incluso aquellos que no se usan comúnmente en seres humanos, pueden todavía emplearse en animales, en los que, por ejemplo, se desean producir anticuerpos u obtener posteriormente linfocitos T activados. La toxicidad u otros efectos adversos que pueden resultar de tanto el adyuvante como las células, por ejemplo, como puede producirse usando células tumorales no irradiadas, es irrelevante en tales circunstancias.

20 Un grupo de adyuvantes preferidos para su uso en algunas realizaciones de la presente invención son aquellos que pueden codificarse por un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN). Se contempla que tales adyuvantes pueden codificarse en un ácido nucleico (por ejemplo, un vector de expresión) que codifica el antígeno, o en un vector separado u otra construcción. Estos ácidos nucleicos que codifican los adyuvantes pueden administrarse directamente tales como, por ejemplo, con lípidos o liposomas.

25 3. Excipientes, sales y sustancias auxiliares

Una composición antigénica de la presente invención puede mezclarse con uno o más componentes adicionales (por ejemplo, excipientes, sales, etc.) que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con al menos un principio activo (por ejemplo, antígeno). Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos.

35 Una composición antigénica de la presente invención puede formularse en la vacuna como una forma neutra o de sal. Una sal farmacéuticamente aceptable incluye las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del péptido) y aquellos que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Una sal formada con un grupo carboxilo libre también puede derivarse de una base inorgánica tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y combinaciones de las mismas.

40 Además, si se desea, una composición antigénica puede comprender cantidades menores de una o más sustancias auxiliares tales como, por ejemplo, agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, etc., que potencian la eficacia de la composición antigénica o vacuna.

45 I. Preparaciones de vacuna

Una vez producido, sintetizado y/o purificado, un antígeno u otro componente de vacuna puede prepararse como una vacuna para administración a un paciente. La preparación de una vacuna es generalmente bien entendida en la materia, como se ejemplifica por las patentes de EE.UU. n° 4.608.251, 4.601.903, 4.599.231, 4.599.230 y 4.596.792. Tales procedimientos pueden usarse para preparar una vacuna que comprende una composición antigénica que comprende epítopes de proteína de unión a folato y/o variantes como principio(s) activo(s), en vista de la presente divulgación. En realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención se preparan para ser vacunas farmacológicamente aceptables.

55 Las composiciones de vacuna farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más epítopes de proteína de unión a folato y/o variantes o agente adicional disuelto o disperso en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra inapropiada cuando se administran a un animal tal como, por ejemplo, un ser humano, según convenga. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un epítipo de proteína de unión a folato o principio activo adicional será conocida para aquellos expertos en la materia en vista de la presente divulgación, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración a animales (por ejemplo, humana), se entenderá que las preparaciones deben cumplir esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y patrones de pureza según se requiera por la Oficina de Patrones Biológicos de la FDA.

65 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes

antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retraso de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sería conocido para un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990, pág. 1289-1329). La variante de proteína de unión a folato puede comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si va a administrarse en forma sólida, líquida o de aerosol, y si necesita ser estéril para vías de administración tales como inyección. Excepto en la medida de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos puede provocarse por conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, pero no se limitan a, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

La variante de proteína de unión a folato puede formularse en una composición en una base libre, forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libre también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en las que la composición está en una forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende, pero no se limita a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; por el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos tales procedimientos. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones pueden usarse disoluciones o esprays nasales, aerosoles o inhalantes en la presente invención. Tales composiciones se diseñan generalmente para ser compatibles con el tipo de tejido diana. En un ejemplo no limitante, disoluciones nasales son normalmente disoluciones acuosas diseñadas para administrarse a las vías nasales en gotas o esprays. Las disoluciones nasales se preparan de manera que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de manera que se mantenga acción ciliar normal. Así, en realizaciones preferidas, las disoluciones nasales acuosas normalmente son isotónicas o están ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, conservantes antimicrobianos, similares a aquellos usados en preparaciones oftálmicas, fármacos o estabilizadores de fármacos apropiados, si se requiere, pueden incluirse en la formulación. Por ejemplo, se conocen diversas preparaciones nasales comerciales e incluyen fármacos tales como antibióticos o antihistamínicos.

En ciertas realizaciones, la variante de proteína de unión a folato se prepara para administración por vías tales como ingestión oral. En estas realizaciones, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina de vaina dura o blanda), formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, trociscos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales pueden incorporarse directamente con la comida de la dieta. Vehículos preferidos para administración por vía oral comprenden diluyentes inertes, vehículos comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral puede prepararse como un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir, y pueden comprender, por ejemplo, al menos un agente activo, un edulcorante, un conservante, un aromatizante, un colorante, un conservante, o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones preferidas, una composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, aromatizantes, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglutinante tal como, por ejemplo, goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato de dicalcio, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un aromatizante, tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, aromatizante de cereza, aromatizante de naranja, etc.; o combinaciones de los mismos anteriores. Si la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Diversos otros materiales pueden

estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con Shellac, azúcar o ambos.

5 Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios. Los supositorios son formas de dosificación sólida de diversos pesos y formas, normalmente medicados, para inserción en el recto, vagina o uretra. Después de la inserción, los supositorios se ablandan, funden o disuelven en los fluidos de la cavidad. En general, para supositorios, vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles, triglicéridos o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, los supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen, por ejemplo, el principio activo en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 %, y preferentemente aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %.

15 Disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros componentes. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsión, los procedimientos preferidos de preparación son secado a vacío o técnicas de liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de un medio líquido previamente esterilizado por filtración de los mismos. El medio líquido debe estar adecuadamente tamponado, si fuera necesario, y el diluyente líquido se convierte primero en isotónico antes de la inyección con solución salina suficiente o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para inyección directa, en las que se prevé que el uso de DMSO como disolvente produzca la penetración extremadamente rápida, administración de altas concentraciones de los agentes activos a un área pequeña.

25 La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

30 En realizaciones particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

J. Administración de vacunas

35 El modo de administración de una vacuna puede variarse ampliamente. Son aplicables cualquiera de los procedimientos convencionales para administración de una vacuna. Por ejemplo, una vacuna puede administrarse convencionalmente intravenosamente, intradérmicamente, intraarterialmente, intraperitonealmente, intralesionalmente, intracranealmente, intraarticularmente, intraprostáticamente, intrapleuralmente, intratraquealmente, intranasalmente, intravítreamente, intravaginalmente, intratumoralmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intravascularmente, mucosamente, intrapericardialmente, por vía oral, rectalmente, nasalmente, tópicamente, en colirios, localmente, usando aerosol, inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada, bañando directamente células diana, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones de lípidos (por ejemplo, liposomas), o por otro procedimiento o cualquier combinación de lo anterior como sería conocido para un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990).

50 Un programa de vacunación y las dosificaciones pueden variarse de paciente a paciente, teniendo en cuenta, por ejemplo, factores tales como el peso y la edad del paciente, el tipo de enfermedad que está tratándose, la gravedad de la afección de la enfermedad, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, el modo de administración y similares, que pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia.

55 Una vacuna se administra de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad que será terapéuticamente eficaz e inmunogénica. Por ejemplo, la vía intramuscular puede preferirse en el caso de toxinas con semividas cortas *in vivo*. La cantidad que va a administrarse depende del sujeto que va a tratarse, que incluye, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos y el grado de protección deseada. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará según el tamaño del huésped. Cantidades precisas de un principio activo requerido para administrarse dependen del criterio del médico. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1 % de un compuesto activo. En otras realizaciones, el un compuesto activo puede comprender entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en su interior. Sin embargo, un intervalo de dosificación adecuada puede ser, por ejemplo, del orden de varios cientos de microgramos de principio activo por vacunación. En otros ejemplos no limitantes, una dosis puede también comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350

microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por vacunación, y cualquier intervalo derivable en su interior. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente. También son variables una pauta adecuada para administración inicial y administraciones de refuerzo (por ejemplo, inoculaciones), pero están tipificadas por una administración inicial, seguida de posterior(es) inoculación (inoculaciones) u otra(s) administración (administraciones).

En muchos casos se deseará tener múltiples administraciones de la vacuna, normalmente que no superen las seis vacunaciones, más normalmente que no superen las cuatro vacunaciones y preferentemente una o más, normalmente al menos aproximadamente tres vacunaciones. La vacunaciones serán normalmente a intervalos de dos a doce semanas, más normalmente intervalos de tres a cinco semanas. Se desearán refuerzos periódicos a intervalos de 1-5 años, normalmente tres años, para mantener los niveles protectores de los anticuerpos.

El curso de la inmunización puede ir seguido de ensayos para anticuerpos para los antígenos de sobrenadante. Los ensayos pueden realizarse marcando con marcas convencionales, tales como radionúclidos, enzimas, fluorescentes y similares. Estas técnicas son muy conocidas y pueden encontrarse en una amplia variedad de patentes, tales como las patentes de EE.UU. n° 3.791.932; 4.174.384 y 3.949.064, como ilustrativas de estos tipos de ensayos. Pueden realizarse otros ensayos inmunitarios y pueden realizarse ensayos de protección de la exposición a la variante de proteína de unión a folato, tras la inmunización.

K. Potenciamiento de una respuesta innata

La presente invención incluye un procedimiento de potenciamiento de la respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende las etapas de poner en contacto uno o más linfocitos con una composición antigénica de variante de proteína de unión a folato, en el que el antígeno comprende como parte de su secuencia una secuencia según SEC ID N°: 2 a SEC ID N°: 8, o un equivalente inmunológicamente funcional de las mismas. En ciertas realizaciones, el uno o más linfocitos está comprendido en un animal, tal como un ser humano. En otras realizaciones, el (los) linfocito(s) puede(n) aislarse de un animal o de un tejido (por ejemplo, sangre) del animal. En ciertas realizaciones preferidas, el (los) linfocito(s) son linfocito(s) de sangre periférica. En ciertas realizaciones, el uno o más linfocitos comprenden un linfocito T o un linfocito B. En una faceta particularmente preferida, el linfocito T es un linfocito T citotóxico.

La respuesta inmunitaria potenciada puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva. Alternativamente, la respuesta puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en el que se obtienen linfocito(s) de un animal (por ejemplo, un paciente), luego se pulsan con composición que comprende una composición antigénica. En una realización preferida, el (los) linfocito(s) puede(n) administrarse al mismo animal o a diferentes (por ejemplo, mismos donantes o diferentes).

1. Linfocitos T citotóxicos

En ciertas realizaciones, los linfocitos T se activan específicamente por contacto con una composición antigénica de la presente invención. En ciertas realizaciones, los linfocitos T se activan por contacto con una célula presentadora de antígeno que es o ha estado en contacto con una composición antigénica de la invención.

Los linfocitos T expresan un receptor de unión a antígeno único sobre su membrana (receptor de linfocitos T), que puede solo reconocer antígeno en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de otras células. Hay varias poblaciones de linfocitos T, tales como células T colaboradoras y linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T colaboradores y los linfocitos T citotóxicos se distinguen principalmente por su expresión de las glicoproteínas CD4 y CD8 unidas a la membrana, respectivamente. Los linfocitos T colaboradores secretan diversas linfocinas, que son cruciales para la activación de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, macrófagos y otras células del sistema inmunitario. A diferencia, un linfocito T citotóxico que reconoce un complejo de antígeno-MHC prolifera y se diferencia en una célula efectora llamada un linfocito T citotóxico (CTL). Los CTL eliminan células del cuerpo que expresan antígeno produciendo sustancias que producen la lisis de células.

La actividad de CTL puede evaluarse mediante procedimientos descritos en el presente documento o como serían conocidos para un experto en la materia. Por ejemplo, los CTL pueden evaluarse en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recientemente aisladas en una línea celular expandida de IL-2 estimulada con fitohemaglutinina establecida a partir de CMSP (Bernard y col., 1998) o por linfocitos T aislados de un sujeto previamente inmunizado y reestimulado durante 6 días con DC infectadas con un vector de adenovirus que contiene antígeno usando ensayos convencionales de microtoxicidad de liberación de ⁵¹Cr en 4 h. En otro ensayo

fluorométrico desarrollado para detectar citotoxicidad mediada por células, el fluoróforo usado es la molécula no tóxica azul de alamar (Nociari y col., 1998). El azul de alamar se extingue fluorescentemente (es decir, rendimiento de bajos cuantos) hasta que se produce la reducción mitocondrial, que luego produce un espectacular aumento en la intensidad de fluorescencia del azul de alamar (es decir, aumento en el rendimiento cuántico). Se informa que este ensayo es extremadamente sensible, específico y requiere un número significativamente menor de células efectoras que el ensayo convencional de liberación de ⁵¹Cr.

En ciertos aspectos, las respuestas de linfocitos T colaboradores pueden medirse por ensayo *in vitro* o *in vivo* con péptidos, polipéptidos o proteínas. Los ensayos *in vitro* incluyen medición de una liberación de citocinas específicas por enzima, radioisótopo, cromóforo o ensayos fluorescentes. Los ensayos *in vivo* incluyen respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado llamadas pruebas de la piel, como sería conocido para un experto habitual en la materia.

2. Células presentadoras de antígeno

En general, el término “célula presentadora de antígeno” puede ser cualquier célula que realice el objetivo de la invención ayudando en la potenciación de una respuesta inmunitaria (es decir, de los brazos de linfocitos T o linfocitos B del sistema inmunitario) contra un antígeno (por ejemplo, una variante de proteína de unión a folato o un equivalente inmunológicamente funcional) o composición antigénica de la presente invención. Tales células pueden definirse por aquellos expertos en la materia usando procedimientos desvelados en el presente documento y en la materia. Como se entiende por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Kuby, 1993), y se usa en el presente documento en ciertas realizaciones, una célula que muestra o presenta un antígeno normalmente o preferencialmente con un molécula o complejo mayor de histocompatibilidad de clase II para una célula inmunitaria es una “célula presentadora de antígeno”. En ciertos aspectos, una célula (por ejemplo, una célula APC) puede fusionarse con otra célula, tal como una célula recombinante o una célula tumoral que expresa el antígeno deseado. Los procedimientos de preparación de una fusión de dos o más células son muy conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los procedimientos desvelados en Goding, pág. 65-66, 71-74 1986; Campbell, pág. 75-83, 1984; Kohler y Milstein, 1975; Kohler y Milstein, 1976, Gefter y col., 1977. En algunos casos, la célula inmunitaria a la que una célula presentadora de antígeno muestra o presenta un antígeno es una célula CD4⁺TH. Moléculas adicionales expresadas sobre las células inmunitarias APC u otras pueden ayudar o mejorar la potenciación de una respuesta inmunitaria. Moléculas secretadas o solubles, tales como, por ejemplo, inmunomoduladores y adyuvantes, pueden también ayudar o potenciar la respuesta inmunitaria contra un antígeno. Tales moléculas son muy conocidas para un experto en la materia, y diversos ejemplos se describen en el presente documento.

VII. Formulaciones de péptidos

Los péptidos que contienen los motivos de epítopes descritos en el presente documento se contemplan para su uso en terapéuticos para proporcionar dianas de FBP universales y antígenos para CTL en el sistema HLA-A2. El desarrollo de terapéuticos basados en estas novedosas secuencias proporciona la inducción de células inmunitarias reactivas frente a tumores *in vivo* mediante la formulación de vacunas contra el cáncer sintéticas, además de la inducción de linfocitos T reactivos frente a tumores *in vitro* mediante tanto mediadas por péptidos (por ejemplo, lipopéptido) como mediadas por célula (por ejemplo, líneas EBV-B usando tanto transfectantes autólogos como HLA-A2 en los que se introduce el gen para el péptido de interés, y el péptido se expresa asociado a HLA-A2 sobre la superficie). También se contempla el uso de estos novedosos péptidos como componentes de vacunas para prevenir o reducir la probabilidad de progresión del cáncer.

Los péptidos contemplados, para su uso, que son más pequeños que otras composiciones, tales como proteínas de la envuelta, tendrán biodisponibilidad y semividas mejoradas. Si se desea, el examen de estabilidad puede realizarse sobre los péptidos, que incluye, por ejemplo, pre-incubación en suero y plasma humano; tratamiento con diversas proteasas; y también análisis de estabilidad de la temperatura y el pH. Si se encuentra que es necesario, la estabilidad de los péptidos sintéticos puede potenciarse por uno cualquiera de una variedad de procedimientos tales como, por ejemplo, empleando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos para la síntesis de péptidos; usando grupos de bloqueo como t-boc y similares; o encapsulando los péptidos dentro de liposomas. La biodisponibilidad de mezclas seleccionadas de péptidos también puede determinarse inyectando péptidos radiomarcados en animales experimentales, tales como ratones y/o monos Rhesus, y posteriormente analizando su distribución en tejido.

Si se desea el potenciamiento de la estabilidad, se contempla que el uso de aminoácidos dextrógiros (D-aminoácidos) sería ventajoso ya que esto produciría incluso mayor biodisponibilidad debido a la incapacidad de proteasas de atacar estos tipos de estructuras. Los péptidos de la presente invención también pueden estabilizarse adicionalmente, por ejemplo, mediante la adición de grupos a los extremos N o C, tales como por acilación o aminación. Si se desea, los péptidos podrían estar incluso en forma de péptidos con cola de lípido, formulados en micelas similares a tensioactivos, u otros multímeros de péptidos. La preparación de multímeros de péptidos y micelas similares a tensioactivos se describe en detalle en el n° de serie de EE.UU. 07/945.865. Se contempla que las composiciones de la presente invención son particularmente ventajosas para su uso en terapéuticos antitumorales/contra el cáncer económicos y seguros, y pueden probarse formulaciones terapéuticas específicas en modelos animales experimentales, tales como ratones, ratas, conejos, cobayas, gatos, cabras, monos Rhesus,

chimpancés y similares, con el fin de determinar más precisamente las formas de dosificación requeridas.

Además de los compuestos de peptidilo descritos en el presente documento, los inventores también contemplan que puedan formularse otros compuestos estéricamente similares para imitar las porciones clave de la estructura del péptido y que tales compuestos también pueden usarse del mismo modo que los péptidos de la invención. Esto puede lograrse por las técnicas de modelado y diseño químico conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden emplearse esterificación y otras alquilaciones para modificar el extremo de un péptido para imitar una estructura de motivo terminal particular. Se entenderá que todas aquellas construcciones estéricamente similares se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente invención comprenderán generalmente una cantidad eficaz de un péptido o péptidos estimulantes de CTL, disuelto o disperso en un medio farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica, tóxica, o de otro modo adversa, cuando se administran a un ser humano. Medios o vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas.

También pueden incorporarse principios activos suplementarios en las composiciones terapéuticas de la presente invención. Por ejemplo, los péptidos estimulantes también pueden combinarse con péptidos que incluyen epítopes inductores de linfocitos T citotóxicos o linfocitos T colaboradores (como se desvela en el documento de EE.UU. n° de serie 071945.865) para crear mezclas de péptidos para inmunización y tratamiento.

La preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas que contienen un péptido o péptidos estimulantes de CTL, que incluyen péptidos dextrógiros, como principios activos será conocida para aquellos expertos en la materia en vista de la presente divulgación. Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones; formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración por vía oral; como cápsulas de liberación con el tiempo; o en cualquier otra forma actualmente usada, que incluye cremas, lociones, enjuagues bucales, inhalantes y similares.

Pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezcladas con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Se prefieren disoluciones estériles adecuadas para administración intravenosa en ciertas realizaciones y se contempla que son particularmente eficaces en estimular CTL y/o producir una respuesta inmunitaria en un animal. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Un péptido o péptidos pueden formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, entre otras cosas, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerida en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse, entre otras cosas, por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido

de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y técnicas de liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

También se contempla la preparación de disoluciones más o altamente concentradas para inyección intramuscular. Se prevé que esto tenga utilidad particular en facilitar el tratamiento de lesiones por pinchazo de aguja a animales o incluso seres humanos. A este respecto se prefiere el uso de DMSO como disolvente, ya que esto producirá penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones del péptido activo, péptidos o agentes a un área pequeña.

También puede ser particularmente útil el uso de formulaciones estériles, tales como lavados basados en solución salina, por veterinarios, técnicos, cirujanos, médicos o profesionales sanitarios para limpiar un área particular en el campo de operación. Las formulaciones terapéuticas según la presente invención también pueden reconstituirse en forma de enjuagues bucales, que incluyen los péptidos solos, o conjuntamente con reactivos antifúngicos. También se prevén formas inhalantes, que de nuevo pueden contener péptidos activos o agentes solos, o conjuntamente con otros agentes, tales como, por ejemplo, pentamidina. Las formulaciones terapéuticas de la invención también pueden prepararse en formas adecuadas para administración tópica, tales como en cremas y lociones.

Conservantes adecuados para su uso en una disolución tal incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato sódico y potásico, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato sódico, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH a entre aproximadamente pH 6 y pH 8, y preferentemente, entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5. Agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro sódico y similares, de forma que el equivalente de cloruro sódico de la disolución oftálmica está en el intervalo del $0,9 \pm 0,2$ %. Antioxidantes y estabilizadores adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, tiourea y similares. Agentes humectantes y clarificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Agentes que aumentan la viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, petrolato, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares.

Tras la formulación, los terapéuticos se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en cantidad tal que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares. Como se usa en el presente documento, "cantidad farmacológicamente eficaz" significa que se usa una cantidad de composición que contiene una cantidad de un péptido o péptidos suficiente para estimular significativamente un CTL o generar una respuesta inmunitaria en un animal.

En este contexto, la cantidad de péptido(s) y el volumen de composición que va a administrarse depende del huésped animal que va a tratarse tal como la capacidad del sistema inmunitario del animal huésped para producir una respuesta inmunitaria. Cantidades precisas de péptido activo que se requiere administrar dependen del criterio del médico y son particulares para cada individuo.

Normalmente se utiliza un volumen mínimo de una composición requerida para dispersar el péptido. También son viables pautas adecuadas para la administración, pero se tipificarían administrando inicialmente el compuesto y monitorizando los resultados y luego administrando más dosis controladas a intervalos adicionales. Por ejemplo, para administración parenteral, una disolución acuosa adecuadamente tamponada, y si fuera necesario, isotónica, se prepararía y usaría para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o incluso intraperitoneal. Una dosificación podría disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y tanto añadirse a 1000 ml de fluido de lisis hipodérmico como inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580).

En ciertas realizaciones, los compuestos activos pueden administrarse por vía oral. Esto se contempla para agentes que son generalmente resistentes, o se han convertido en resistentes, a la proteólisis por enzimas digestivas. Se contempla que tales compuestos incluyan agentes químicamente diseñados o modificados; péptidos dextrógiros; y formulaciones de péptido y liposómicas en cápsulas de liberación controlada para evitar la degradación por peptidasas, proteasas y/o lipasas.

Las formulaciones orales pueden incluir compuestos en combinación con un diluyente inerte o un vehículo comestible que puede ser asimilado; aquellos encerrados en cápsulas de gelatina de vaina dura o blanda; aquellos comprimidos en comprimidos; o aquellos incorporados directamente con la comida de la dieta. Para administración terapéutica oral, los compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos

ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener generalmente al menos el 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60 % del peso de la unidad. La cantidad de compuestos activos en tales composiciones terapéuticamente útiles es de forma que se obtendrá una dosificación adecuada.

Comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: puede añadirse un aglutinante, como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y un edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina, o un aromatizante, tal como menta, aceite de gaulteria o aromatizante de cereza. Si la forma unitaria de dosificación es una cápsula puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con Shellac, azúcar o ambos. Un jarabe de elixir puede contener los compuestos activos sacarosa como edulcorante, metil y propilparabeno como conservantes, un colorante y aromatizante, tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Los péptidos pueden usarse en su capacidad inmunizante administrando una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria en un animal. En este sentido, una "cantidad eficaz tal para generar una respuesta inmunitaria" significa una cantidad de composición que contiene un péptido o mezcla de péptidos suficiente para producir significativamente una respuesta antigénica en el animal.

VIII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por aquellos expertos en la materia que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y así puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos expertos en la materia deben, en vista de la presente divulgación, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y todavía obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

FUNDAMENTO PARA EL DISEÑO DE VARIANTES

Estudios en modelos experimentales sobre el desarrollo de linfocitos en el timo muestran que la interacción de timocitos con agonistas débiles o nulos (sin efecto aparente) conducen a selección positiva (es decir, supervivencia) de pacientes que responden a un Ag específico, mientras que la estimulación con agonistas fuertes conduce a selección negativa (delección de CTL reactivos). Similarmente, estudios recientes sobre respuestas de células CD8⁺ de sangre periférica muestran que las variantes de Ag con actividad agonista nula o débil indujeron la expansión de precursores de CTL que responden a un Ag modelo, pero no a función efectora. Estos resultados se obtuvieron con animales transgénicos, y los receptores de los CTL se irradiaron fuertemente. Hay poca información referente a cómo los pacientes que responden a tumor, y/o sus precursores, pueden mantenerse y evitar la eliminación en individuos sanos, o pacientes sin pruebas de enfermedad. Sin embargo, la presencia de tales precursores, o de CTL activados que reconocen Ag tumoral (Peoples y col., 1998; Hudson y col., 1998; Peoples y col., 1998; Kim y col., 1999; Lee y col., 2000) es una prueba de que tales respondedores existen en la sangre periférica. Los enfoques para promover su supervivencia, expansión e inducción de formación lítica son beneficiosos para los pacientes. Si los respondedores elegidos como diana para la supervivencia son CTL de baja afinidad, se espera que la débil afinidad sea compensada por un aumento significativo en los números de efectores. Si los respondedores son de alta afinidad, la protección de AICD también permitirá su expansión.

Para diseñar Ag "inductores de supervivencia", la presente invención se basa en el epítipo de FBP E39: EIWTHSYKV. Este epítipo es reconocido, aunque con baja afinidad, por CTL reactivos frente a tumor de ovario y de mama. Se predijo que la inmunogenicidad mejorada en términos de ganancia neta en números de células que reaccionan con el Ag natural se logra reduciendo la carga positiva en el aminoácido en la posición 5 (histidina) y sustitución de histidina con fenilalanina (Phe). La Phe no está cargada, pero su anillo aromático de benceno es una sustitución próxima para el anillo de histidina de imidazol. Para garantizar una mejor flexibilidad de los residuos en el péptido, la estructura fenólica de la tirosina se sustituyó con la cadena central alifática de treonina (Thr). Tanto Tyr como Thr contienen un grupo de cadena lateral OH (hidroxilo). Así se eliminaron la carga positiva en la posición 5 y la estructura rígida de Tyr. En una realización específica, esto aumenta la flexibilidad de los residuos 5-9 (SYKV) en el péptido y permite un mejor ajuste del TCR con el complejo de MHC de péptido. La variante: E 1 W T E S I K V se designó J65. Se crearon variantes adicionales de J65 con cambios en la posición 7 (Tyr)→Thr solo = designado J77, en la posición 5 solo Phe→His = designado J78, y en posiciones 1 y 6. Estos análogos/variantes se enumeran en la

Tabla 5.

Tabla 5: Variantes de proteína de unión a folato

	VARIANTE	SECUENCIA	CAMBIO
5	E39	EIWTHSYKV (SEQ ID NO:268)	Tipo salvaje
	J77	EIWTHSTKV (SEQ ID NO:1)	Y7→T
	J78	EIWTF SYKV (SEQ ID NO:2)	H5→F
10	J68	FIWTFATKV (SEQ ID NO:3)	E1→F, H5→F, Y7→T
	J67	EIWTHATKV (SEQ ID NO:4)	S6→A, Y7→T
	J66	FIWTFSTKV (SEQ ID NO:6)	E1→F, H5→F, Y7→T
15	J65	EIWTFSTKV (SEQ ID NO:5)	H5→F, Y7→T
	J64	GIWTHSTKV (SEQ ID NO:7)	E1→G, Y7→T
	J63	FIWTHSTKV (SEQ ID NO:8)	E1→F, Y7→T

20 La selección de estas variantes de Ag se hizo sobre el principio de alteración de Ag que tiene como objetivo alternar la señalización. Además de las sustituciones H→F (Pos. 5) y Y→T (Pos. 7), se introdujeron sustituciones en las otras posiciones: S→A (Pos. 6 y Glu (B)→F y E→Gly (G) (en Pos. 1). El fin de estas sustituciones fue eliminar posibles grupos de reacción con el TCR. En la sustitución S→A (Pos. A), este cambio elimina un grupo OH de la cadena lateral. En la posición 1, la sustitución E (ácido glutámico)→glicina, elimina la cadena lateral alifática entera más el grupo COO cargado. También en la posición 1, la sustitución E→F (elimina el grupo COO cargado, pero introduce un anillo aromático). Estas sustituciones tienen como objetivo disminuir la reactividad del péptido con el TCR.

30 EJEMPLO 2

INDUCCIÓN DE IFN- γ Y ACTIVIDAD DE CTL

35 También se ha determinado la capacidad estabilizante de HLA-A2 de los péptidos de variante (FIG. 1). Los resultados muestran que la capacidad estabilizante de J65 es casi la mitad de la capacidad estabilizante de E39. A diferencia, sustituciones en la posición 1 aumentan la afinidad de unión del péptido. Los resultados en la FIG. 2 muestran la actividad citolítica de CTL inducidos con J65 en comparación con CTL inducidos con E39. Los resultados indican que J65 fue un inductor más débil de IFN- γ de los 3 x cultivos estimulados con J65 que J77 y E39, sugiriendo que los cambios en la secuencia tuvieron efectos acumulados en la disminución de la inducción de IFN- γ .

40 Para tratar los efectos de variantes de FBP sobre la inducción de la actividad de CTL, cultivos de CMSP de donante sano estimuladas tres veces con J65 se fraccionaron en tres y se reestimularon con tanto B39 como J65 o J77. Se preparó un cultivo de control de las mismas CMSP estimuladas tres veces con E39 y se reestimularon con E39 por cuarta vez. Las CMSP estimuladas tres veces con E39 (3 x E39) seguido de E39 mostraron reconocimiento débil de E39 después de la estimulación con B39. Se observó un cuadro similar con 3 x células J65 reestimuladas con J65, mientras que 3 x J65 reestimuladas con J77 mostraron actividad de CTL significativamente inferior a 3 x J65 estimuladas con los otros péptidos. Se informó recientemente que los CTL de memoria que reaccionan con el Ag tumoral tal como FBP están presentes en la sangre de individuos sanos (Lee y col., 2000). Estas células pueden activarse fácilmente por estimulación con el péptido correspondiente presentado sobre células dendríticas (Kim y col., 1999). Para evaluar la capacidad estimulante de los análogos J65 y J77, las CMSP de un donante que responde al tratamiento se estimularon con E39, J65 y J77. Estos resultados muestran que la función potenciadora de J65 en la proliferación y citotoxicidad de los pacientes que responden al tratamiento no refleja la secreción potenciada de IL-2 y/o IFN- γ en comparación con el Ag natural, pero su actividad inductora de citocinas más débil parece proteger CTL de mayor afinidad de la apoptosis evitando la estimulación en exceso.

55 EJEMPLO 3

INDUCCIÓN DE IL-2 ESPECÍFICA SENSIBILIZANDO CON VARIANTES DE FBP

60 En CTL sensibilizadas con J65, la mayor actividad de CTL y secreción de IFN- γ puede provocarse por el epítipo natural E39, sugiriendo un efecto protector de las estimulaciones previas. Los resultados en la FIG. 3 muestran que J65 y J77 indujeron menores niveles de IL-2 en las CMSP de este donante en comparación con el péptido natural E39. Para identificar cuál de las variantes de E39 indujo mayor expansión de células, las CMSP del mismo donante se estimularon tres veces con el péptido correspondiente, y las células vivas resultantes se contaron una semana después de cada estimulación. Los resultados en la FIG. 4 muestran que los cultivos estimulados con E39 se

expandieron inicialmente más rápido que los otros cultivos; sin embargo, después de la tercera estimulación, los cultivos estimulados con J65 aumentaron más rápidamente en números. A diferencia, los cultivos estimulados con J78 (H→F) y J77 (Y→T) proliferaron más lentamente que los cultivos de control que no se estimularon con péptido. Se obtuvieron resultados similares con J65 en otro donante (FIG. 5). En este donante, las células estimuladas con E39 murieron después de la tercera estimulación mientras que las células estimuladas por J65 se expandieron más rápidamente. Las células estimuladas con J77 y J78 también se expandieron, pero a una menor velocidad.

REFERENCIAS

PATENTES

- Patente de EE.UU. 3.826.364; concedida el 30 de julio de 1974.
- Patente de EE.UU. 4.284.412; concedida el 18 de agosto de 1981.
- Patente de EE.UU. 4.498.766; concedida el 12 de febrero de 1985.
- Patente de EE.UU. 4.578.770; concedida el 25 de marzo de 1986.
- Patente de EE.UU. 4.596.792; concedida el 24 de junio de 1986.
- Patente de EE.UU. 4.599.230; concedida el 8 de julio de 1986.
- Patente de EE.UU. 4.599.231; concedida el 8 de julio de 1986.
- Patente de EE.UU. 4.601.903; concedida el 22 de julio de 1986.
- Patente de EE.UU. 4.608.251; concedida el 26 de agosto de 1986.
- Patente de EE.UU. 4.661.913; concedida el 28 de abril de 1987.
- Patente de EE.UU. 4.714.682; concedida el 22 de diciembre de 1987.
- Patente de EE.UU. 4.767.206; concedida el 30 de agosto de 1988.
- Patente de EE.UU. 4.774.189; concedida el 27 de septiembre de 1988.
- Patente de EE.UU. 4.857.451; concedida el 15 de agosto de 1989.
- Patente de EE.UU. 4.989.977; concedida el 5 de febrero de 1991.
- Patente de EE.UU. 5.160.974; concedida el 3 de noviembre de 1992.
- Patente de EE.UU. 5.478.722; concedida el 26 de diciembre 1995.

PUBLICACIONES

- Acres B., Hareuveni M., Balloul J. M. y Kieny M. P. (1993) VV-MUC1 immunisation of mice-immune response and protection against the growth of murine tumours bearing the MUC1 antigen J. Immunother. 14:136-143.
- Acres B., Apostolopoulos V., Balloul J.M., Wreschner D. Xing P. X., Hadi D. A. y col., (1999) MUC1 specific cytotoxic T cell precursor analysis in human MUC1 transgenic mice immunised with human MUC1 vaccines. Cancer Immunol. Immunother. 2000 Jan; 48(10):588-94.
- Almendro y col., "Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization," J Immunol. 157(12):5411-5421, 1996.
- Anichini, A. y col., (1993) y col., J. Exp. Med. 177:989-998.
- Apostolopoulos V., Haurum J.S. y McKenzie I.F.C. (1997) MUC1 peptide epitopes associated with 5 different H2 class I molecules. Eur. J. Immunol. 27:2579-2587.
- Apostolopoulos V., Karanikas V., Haurum J. y McKenzie I.F.C. (1997) Induction of HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes to the MUC1 human breast cancer antigen J. Immunol. 159:56211-5218.
- Apostolopoulos V., Chelvanayagam G., Xing P.-X y McKenzie I.F.C. (1998) Anti-MUC1 antibodies react directly

- with MUC1 peptides presented by class I 142 and HLA molecules *J. Immunol.* 161:767-775.
- Apostolopoulos V., Xing P.-X. y McKenzie I. F. C. (1994) Murine immune response to cells transfected with human MUC1: Immunisation with cellular and synthetic antigens. *Cancer Res.* 54: 5186-5193.
- 5 Apostolopoulos V., Pietersz G. A., Loveland B. E., Sandrin M. S. y McKenzie I. F. C. (1995) Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10128-10132.
- 10 Apostolopoulos V., Popovski V. y McKenzie LF.C. (1998) Cyclophosphamide enhances the CTL precursor frequency in mice immunized with MUC1-mannan fusion protein (M-FP). *J. Immunother.* 21:109-113.
- Astori M. y Krachenbuhl J. P. (1996) Recombinant fusion peptides containing single or multiple repeats of a ubiquitous T-helper epitope are highly immunogenic. *Mol. Immunol.* 33: 1017-1024.
- 15 Harth, R. J., y col., (1991) *J. Exp. Med.* 173:647-658.
- Bartnes K., Hannestad K., Guichard G. y Briand J.P. (1997) A retro-inverso analog mimics the cognate peptide epitope of a CD4+ T cell clone. *Bur. J. Immunol.* 27:1387-1391.
- 20 Beekman N. J., Schaaper W. M., Tesser G. I., Dalsgaard K., Kamstrup S., Langeveld J.P. y col., (1997) Synthetic peptide vaccines: palmitoylation of peptide antigens by a thioester bond increases immunogenicity. *J. Pept. Res.* 50: 357-364.
- 25 BenMohamed L., Gras-Masse H., Tarter A., Daubersies P., Bahimi K., Bossus M. y col., (1997) Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B. T. helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees,. *Eur. J. Immunol.* 27: 1242-1253.
- Blaese, R. M., *Pediatr. Res.*, 33 (1 Suppl):S49-S53 (1993).
- 30 Briand J. P., Benkirane N., Guichard G., Newman J.F.E., Van Regenmortel M.H., Brown F. y col., (1997) A retro-inverso peptide corresponding to the GH loop of foot-and-mouth disease virus elicits high levels of long-lasting protective neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12545-12550.
- 35 Chakraborty N. G., Sporn J. R., Tortora A. F., Kurtzman S. H., Yamase H., Ergin M. T. y col., (1998) Immunization with a tumor-cell-lysate-loaded autologous-antigen-presenting-cell-based vaccine in melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 47: 58-64.
- 40 Chen T. T., Tao M. H. y Levy R. (1994) Idiotype-cytokine fusion proteins as cancer vaccines. Relative efficacy of IL-2, IL-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 153:4775-4787.
- Ciupitu A.M. Petersson M., O'Donnell C.L., Williams K., Jindal S., Kiessling R. y col., (1998) Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187:685-691.
- 45 Creswell P. (1994) Assembly, transport and function of MHC class I molecules. *Ann. Rev. Immunol.* 12:259-293.
- Culver, L. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3155-3159 (1991).
- 50 Dalglish, A.G. Cancer vaccines. *Br. J. Cancer* 82(10): 1619-1624.
- Darrow, T. L., y col., (1989) *J. Immunol* 142:3329-3335.
- 55 DeLeo A.B. (1998) p53-based immunotherapy of cancer. *Crit. Rev. Immunol.* 18: 29-35.
- Deprez B., Sauzet J. P., Boutillon C., Martinon F., Tartar A., Sergheraert C. y col., (1996) Comparative efficiency of simple lipopeptide constructs for in vivo induction of virus-specific CTL. *Vaccine* 14: 375-382.
- 60 Derossi D., Joliot G., Chassaing G. y Prochiantz A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 10444-10450.
- Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G. y Prochiantz A. (1996) Cell internalization of the helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271: 18188-18193.
- 65 Ding L., Lalani E. N. y Reddish M. (1993) Immunogenicity of synthetic peptides related to the core peptide sequence encoded by the human MUC1 gene: effect of immunisation on the growth of murine mammary

adenocarcinoma cells transfected with the human MUC1 gene. *Cancer Immunol. Immunother.* 36:9-17.

Disis M. L., Bernhard H., Shiota F.M., Hand S. L., Gralow J.R., Huseby E.S. y col., (1996) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines *Blood* 88:202-210

Donnelly J. J., Ulmer J.B., Hawe L. A., Friedman A., Shi X.P., Leander K.R. y col., (1993) Targeted delivery of peptide epitopes to class I major histocompatibility molecules by a modified *Pseudomonas* exotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3530-3534.

Elwood, P.C. Molecular cloning and characterization of the human folate binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells. *J. Biol. Chem.* 264: 14893-14901, 1989.

Fayolle C., Sebo P., Ladant D., Ullmann A. y Leclerc C. (1996) In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8+ T cell epitopes. *J. Immunol.* 156:4697-4706.

Fukasawa M., Shimizu Y., Shikata K., Nakata M., Sakat-ibara R., Yamamoto N. y col., (1998) Liposome oligomannase-coated with neoglycolipid, a new candidate for a safe adjuvant for induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *FEBS Lett.* 441: 353-356.

Garin-Chesa, P., Campbell, I. Suigo, P.E. , Lewis, J.L., Old, L.J. y Rettig, W.J. Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate binding protein. *Am. J. Pathol.*, 142: 557-567, 1993.

Gendler S.J., Papadimitriou J.T., Duhig T., Rothbard J. y Burchelt J. (1998) A highly immunogenic region of human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats, *J. Biol. Chem.* 263:12820-12823.

Goletz T. J., Klimpel K.R., Arora N., Leppla S. H., Keith J. M. y Berzofsky J.A. (1997) Targeting HIV proteins to the major histocompatibility complex class I processing pathway with a novel gp120-anthrax toxin fusion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12059-12064.

Gong J., Chen D., Kashiwaba M. y Kufe D. (1997) Induction of antitumour activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nature Med.* 3: 338-361.

Gong J., Chen D., Kashiwaba M., Li Y., Chen L., Takeuchi H. y col., (1998) Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6279-6283.

Goydos J. S., Elder E., Whiteside T. L., Finn O. J. y Lotze M. T. (1996) A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 63: 298-304.

Gras-Masse H., Boutillon C., Diesis E., Deprez B. y Tartar A. (1997) Confronting the degeneracy of convegent combinatorial immunogens or 'mixotopes', with the specificity of recognition of the target sequences. *Vaccine* 15:1568-1578.

Guan H. H., Budzynski W., Koganty R.R., Kantz M.J., Reddish M.A., Rogers J.A. y col., (1998) Liposomal formulations of synthetic MUC1 peptides: effects of encapsulation versus surface display of peptides on immune responses. *Bioconjug. Chem.* 9:451-458.

Guichard G., Connan F., Graff R., Ostankovitch M., Muller S., Guillet J.G. y col., (1996) A partially modified retro-inverso pseudopeptide as a non-natural ligand for the human class I histocompatibility molecule HLA-A2. *J. Med. Chem.* 39: 2030-3039.

Hurpin C, Rotario C, Bisceglia H, Chevalier M, Tartaglia J, Erdile L. The mode of presentation and route of administration are critical for the induction of immune responses to p53 and antitumor immunity. *Vaccine.* 1998 Jan-Feb;16(2-3):208-15.

Heeg K., Kuon W. y Wagner H. (1991) Vaccination of class I major histocompatibility complex (MHC)-restricted murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes towards soluble antigens: immunostimulating-ovalbumin complexes enter the class I MHC-restricted antigen pathway and allow sensitization against the immunodominant peptide. *Eur. J. Immunol.* 21: 1523-1527.

Heike M., Noll B. y Meyer zum Buschenfelde K.H. (1996) Heat shock protein-peptide complexes for use in

- vaccines. *J. Leukoc. Biol* 60: 153-158.
- 5 Henderson R A., Konitsky W. M., Barratt-Boyes S. M., Soares M., Robbins P. D. y Finn O.J. (1998) Retroviral expression of MUC-1 human tumor antigen with intact repeat structure and capacity to elicit immunity in vivo. *J. Immunother.* 21:247-256.
- 10 Henderson R. A., Nimgaonkar M. T., Watkins S. C., Robbins P. D., Ball E. D. y Finn O. J. (1996) Human dendritic cells genetically engineered to express high levels of the human epithelial tumor antigen mucin (MUC-1). *Cancer Res.* 56:3763-3770.
- 15 Herve M., Maillere B., Mourier G., Texier C., Leroy S. y Menez A. (1997) On the immunogenic properties of retro-inverso peptides. Total retro-inversion of T-cell epitopes causes a loss of binding to MHC II molecules. *Mol. Immunol.* 34:157-163.
- 20 Hom S. S., y col., (1991) *J. Immunother.* 10:153-164.
- Hom S. S., y col., (1993) *J. Immunother.* 13:18-30.
- Hsu S. C., Schadeck E. B., Delmas A., Shaw M. y Stewart M.W., (1996) Linkage of a fusion peptide to a CTL epitope from the nucleoprotein of measles virus enables incorporation into ISCOMs and induction of CTL responses following intranasal immunization. *Vaccine* 14: 1159-1166.
- Hwu, P. y col., *J. Immunol*, 150:4104-415 (1993).
- 25 Itoh, K. y col., (1986), *Cancer Res.* 46:3011-3017.
- Jerome K. R., Domenech N. y Finn O. J. (1993) Tumor-specific CTL clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin cDNA. *J. Immunol.* 151: 1654-1662.
- 30 Karanikas V., Hwang L., Pearson J., Ong C.S., Apostolopoulos V., Vaughan H. y col., (1997) Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J. Clinical Invest.* 100: 2783-2792.
- 35 Kawakami, Y., y col., (1992) *J. Immunol.* 148:638-643.
- Kawakami, Y., y col., (1993) *J. Immunother.* 14:88-93.
- 40 Kawakami Y., Robbins P.F., Wanx X., Tupesis J.P., Parkhurst M.R., Kang X. y col., (1998) Identification of New melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles *J. Immunology* 161:6985-6992.
- 45 Kim, D., Lee, T.V., Castilleja, A., Anderson, B.W., Papler, G.E. Kudella, A.P., Murray, J.L., Sittisomwong, T., Wharton, J.T., Kim, J. Ioannides, C.G. Folate binding protein peptide 191-199 presented on dendritic cells can simulate CTL from ovarian and breast cancer patients. *Anticancer Res.*, 18:2907-2916, 1999.
- 50 Kim D.T., Mitchell D. J., Brockstedt D.G., Fong L., Nolan G.P., Fathman C.G. y col., (1997) Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J. Immunol:* 159: 1666-1668.
- Kraus y col., alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene," *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- 55 Lareyre y col., "A 5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cell-specific, and androgen-regulated expression of a foreign gene in the epididymis of transgenic mice," *J Biol Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.
- 60 Lee y col., "Activation of beta3-adrenoceptors by exogenous dopamine to lower glucose uptake into rat adipocytes," *J Auton Nerv Syst.* 74(2-3):86-90, 1997.
- 65 Lee, T.V., Anderson, B.W., Peoples, G.E., Castilleja, A., Murray, J.L., Gershenson, D.M., y Ioannides, C.G. Identification of activated tumor-Ag-reactive CD8+cells in healthy individuals, *Oncology Reports*, 7:455-466, 2000.
- Lee R. S., Tartour E., van der Bruggen P., Vantomme V., Joyeaux I., Goud B. y col., (1998) Major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble tumour antigen fused to the B-fragment of

- Shiga toxin. *Eur. J. Immunol.* 28:2726-2737.
- Lees C. J., Apostolopoulos V., Acres B. A., Ong C. S., and T2 cytokines on the cytotoxic T cell response to mannan-MUC1. *Cancer Immunol. Immunother.* 2000 Feb;48(11):644-52.
- 5 Li, P.Y., Del Vecchio, S., Fonti, R., Carrieto, M.V., Potena, M.I., Botti, G., Miotti, S., Lastoria, S., Menard, S., Colnaghi, M.L y Salvatore, M. Local characterization of folate binding protein GP38 in sections of human ovarian carcinoma by in vitro quantitative autoradiography. *J. Nucl. Med.* 37:665-672, 1996.
- 10 Lofthouse S. A., Apostolopoulos V., Pietersz G. A. y McKenzie I. F. C. (1997) Induction of T1 (CTL) and/or T2 (antibody) response to a mucin 1 tumor antigen, *Vaccine* 25; 1586-1593.
- 15 Lustgarten J., Theobald M., Labadic C., LaFacc D., Peterson P., Disis M. L. y col., (1997) Identification of Her-2/NeuCTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD*. *Hum. Immunol.* 52: 109-118.
- 20 Malcherek G., Wirblich C., Willcox N., Rammensee H.G., Trowsdale J. y Melms A. (1998) MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes: engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation. *Eur. J. Immunol.* 28:1524-1533.
- Matco, L., Gardner J., Chen Q., Schmidt C., Down M., Elliott S. L. y col., (1999) An HLA-A2 polyepitope vaccine for melanoma immunotherapy. *J. Immunol.* 163:4058-4063.
- 25 McCarty T.M., Liu X., Sun J.Y., Peralta E.A., Diamond D.J. y Ellenhom J.D. (1998) Targeting p53 for adoptive T-cell immunotherapy. *Cancer Res.* 58: 2601-2605.
- Minev B.R., McFarland B.J., Spiess P.J., Rosenberg S.A. y Restifo N.P. (1994) Insertion signal sequence fused to minimal peptides elicits specific CD8+ T-cell responses and prolongs survival of thymoma-bearing mice. *Cancer Res.* 54:4155-4161.
- 30 Muul, L. M. y col., (1987), *J. Immunol.* 138:989-995.
- Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S. y col., (1997) Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing immune responses to soluble proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:793-797.
- 35 Nakao M., Hazama M., Mayumi-Aono A., Hinuma S. y Fujisawa Y. (1994) Immunotherapy of acute and recurrent herpes simplex virus type 2 infection with an adjuvant-free form of recombinant glycoprotein D-interleukin-2 fusion protein. *J. Infect Dis.* 169:787-791.
- 40 Nestle F.O., Alijagic S., Gilliet M., Sun V., Grabbe S., Dummer R y col., (1998) Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells, *Nature Med.* 4:328-332.
- 45 Noguchi Y., Noguchi T., Sata T., Yokoo Y., Itoh S., Yoshida M. y col., (1991) Priming for in vitro and in vivo anti-human T lymphotropic virus type 1 cellular immunity by virus-related protein reconstituted into liposome. *J. Immunol.* 146: 3599-3603.
- Nomoto y col., "Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression," *Gene*, 236(2):259-271, 1999.
- 50 Obert M., Pikeuger H., Hanagarth II. G., Schulte-Monting J., Wiesmuller K.H., Braun D.G. y col., (1998) Protection of mice against SV40 tumors by Pam3Cys, MTP-PE and Pam3Cys conjugated with the SV40 T antigen-derived peptide K(698)-T(708). *Vaccine* 16: 161-169.
- 55 O'Neil, B. H., y col., (1993) *J. Immunol.* 151:1410-1418.
- Pardoll, D.M. (2000) *Clin. Immunol.* 95 (1): S44-S62.
- 60 Parkhurst M.R., Fitzgerald E.B., Southwood S., Sette A., Rosenberg S.A. y Kawakami Y. (1998) Identification of a shared HLA-A*020 -restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase related protein 2 (TRP2). *Cancer Res.* 58:4895-4901.
- Partidos C. D., Vohra P. y Stewart M. W. (1996) Priming of measles virus-specific CTL responses after immunization with a CTL epitope linked to a fusogenic peptide. *Virology* 215: 107-110.
- 65 Peoples, G.E., Anderson, B.W., Fisk, B., Kudelka, A.P., Wharton, J.T. y Ioannides, C.G. Ovarian cancer-

- associated lymphocytes recognize folate binding protein (FBP) peptides. *Ann. Surg Oncol.*, 5(8):743-750, 1998.
- Peoples, G.E., Anderson, B.W., Murray, J.L., Kudelka, A.P., Eberlein, T.J., Wharton, J.T. y Ioannides, C.G. Vaccine implications of folate binding protein in epithelial cancers. *Clin. Cancer Res.*, 5:4214-4223, 1999.
- 5 Pietersz, G.A. y col., (2000) Generation of cellular immune responses to antigenic tumor peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:290-310.
- Pietersz G. A., Wenjun L., Popovski V., Caruana J. A. Apostolopoulos V. y McKenzie L F. C. (1998) Parameters in using mannan-fusion protein (M-FP) to induce cellular immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* 45: 321-326.
- 10 Rammensee H.G. (1995) Chemistry of peptides associated with MHC class I and class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7:85-96.
- Rammensee H.G., Friede T. y Stevanovic S. (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178-228.
- 15 Reddish M., MacLean G. D., Koganty R. R., Kan-Mitchell J., Jones V., Mitchell M.S. y col., (1998) Anti-MUC1 class I restricted CTLs in metastatic breast cancer patients immunized with a synthetic MUC1 peptide. *Int. J. Cancer* 76: 817-823.
- 20 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990.
- Retrig, W.J., Cordon-Cardo, C., Koulos, J.P., Lewis, J.L., Oertgen, H.F. y Old, L.J. Cell surface antigens of human trophoblast and choriocarcinoma defined by monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* 35: 469-475, 1985.
- 25 Reynolds S.R., Celis E., Sette A., Oratz R., Shapiro RL., Johnston D. y col., (1998) HLA-independent heterogeneity of CDS+ T cell responses to MAGE-3, Melan-A/MART-1, gp 100, tyrosinase, MCIR and TRP-2 in vaccine-treated melanoma patients, *J. Immunol.* 161:6970-6976.
- 30 Rimmelzwaan G.F., Baars M., van Beek R., van Amerongen G., Lovgren-Bengtsson K., Claas E. C. y col., (1997) Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model: comparison of conventional and iscom vaccines. *J. Gen. Virol.* 78:757-765.
- Rivoltini L., Squarcina P., Loftus D.J., Castelli C., Tarsini P., Mazzocchi A. y col., (1999) A superagonist variant of peptide - MART1/Melan A27-35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional characteristics: implication for more effective immunotherapy. *Cancer Res.* 59:301-306.
- 35 Rosenberg, S. A., y col., (1986) *Science* 323:1318-1321.
- Rosenberg, S. A., y col., (1988) *N Engl J Med* 319:1676-1680.
- Rosenberg S. A. (1992) *J. Clin. Oncol.* 10:180-199.
- 40 Rosenberg, S.A. (2000) *Cancer J.* 6, Supp. 2: S 142-S 149.
- Rosenberg S. A., Yang J. C., Schwartzenuber D. J., Hwu P., Marincola F. M., Topalian S. L. y col., (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma, *Nature Med.* 4: 321-327.
- 50 Rowell J.F., Ruff A.L., Guarnieri G.G., Stavelly-O'Carroll K., Lin X., Tang J. y col., (1995) Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J. Immunol.* 155: 1818-1828.
- 55 Rowse G. J., Tempero R. M., VanLith M. L., Hillingsworth M. A. y Gendler S. J. (1998) Tolerance and immunity to MUC1 in a human MUC1 transgenic murine model. *Cancer Res.* 58: 315-321.
- Samuel J., Budynski W. A., Reddish M. A., Ding L., Zimmermann G. I., Krantz M. I. y col., (1998) Immunogenicity and antitumor activity of a liposomal MUC1 peptide-based vaccine. *Int. J. Cancer* 75: 295-302.
- 60 Schutze-Redelmeier M. P., Gournier H., Garcia-Pons F., Moussa M., Joliot A. H., Volovitch M. y col., (1996) Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by *Drosophila antennapedia* homeodomain primes cytotoxic T. cells in vivo. *J. Immunol.* 157:650-655.
- 65 Sensi, M., y col., (1993) *J. Exp. Med.* 178:1231-1246.

- Sjolander A., van't Land B. y Lovgren Bengtsson K., (1997) Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol.* 10:69-76.
- 5 Speir J.A., Abdel-Motal U. M., Jondal M. y Wilson I. A. (1999) Crystal structure of an MHC class I presented glycopeptide that generates carbohydrates-specific CTL. *Immunity* 10:51-61.
- Stenmark H., Moskaug J. O., Madshus I. H., Sandvig K. y Olsnes S. (1991) Peptides fused on the amino-terminal end of diphtheria toxin are translocated to the cytosol. *J. Cell Biol.* 113: 1025-1032.
- 10 Suzue K., Zhou X., Eisen H. N. y Young R.A. (1997) Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13146-13151.
- 15 Tao M. H. y Levy R. (1993) Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine: for B-cell lymphoma. *Nature* 362:755-758.
- Tarpey I., Stacey, S.N., McIndoe A. y Davies D.H. (1996) Priming in vivo and quantification in vitro of class I MHC-restricted cytotoxic T cells to human papilloma virus type 11 early proteins (E6 and E7) using immunostimulating complexes (ISCOMs). *Vaccine* 14: 230-236.
- 20 Theobald M., Biggs J., Dittmer D., Levine A.J. y Sherman L. A. (1995) Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11993-11997.
- 25 Topalian, S. L., y col., (1989) *J. Immunol.* 142:3714-3725.
- Tsumaki y col., "Modular arrangement of cartilage- and neural tissue-specific cis-elements in the mouse alpha2(XI) collagen promoter," *J Biol Chem.* 273(36):22861-22864, 1998.
- 30 Uono H. y Srivastava P.K. (1993) Heat shock protein 70 associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* 178: 1391-1396.
- 35 Van Der Burg S.H., Vissers MJ., Brandt R.M., Kast W. M. y Melief C. J. (1996) Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC peptide complex stability. *J. Immunol.* 156:3308-3314.
- Villacres-Eriksson M. (1995) Antigen presentation by naive macrophages, dendritic cells and B cells primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. *Clin. Exp. Immunol.* 102:46-52.
- 40 Vogel F. R. y Powell M. F. (1995) A compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 6, pp. 141-228, Powell M.F. and Newman M. J. (eds), Plenum Press, New York.
- 45 Weitman, S.D., Lark, R.H., Coney, L.R., Fort, D.W., Frasca, V., Zurawski, V.R., y Kamen, B.A. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res.* 52: 3396-3401, 1992.
- 50 Wu y col., "Promoter-dependent tissue-specific expressive nature of imprinting gene, insulin-like growth factor II, in human tissues," *Biochem Biophys Res Commun* 233(1):221-226, 1997.
- Wu T. C., Guamieri F.G., Staveley-O'Carroll K.F., Viscidi R.P., Levitsky H.I., Hedrick I. y col., (1995) Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:11671-11675.
- 55 Xing P.-X., Tjandra J. J., Stacker S. A., T.J.G., Thompson C.H., McLaughlin P.J. y col., (1989) Monoclonal antibodies reactive with mucin expressed in breast cancer. *Immunol. Cell. Biol.* 67: 183-195.
- Xing P.-X., Apostolopoulos V., Michaels M., Prenzowska J., Bishop J. y McKenzie I. F. C. (1995) Phase I study of synthetic MUC1 peptides in cancer. *Int. J. OncoL* 6:1283-1289.
- 60 Xing P.-X., Reynolds K., Tjandra J. J., Tang X. L. y McKenzie L F. C. (1990) Synthetic peptides reactive with anti-human milk fat globule membrane monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 50:89-96.
- Zeng Z.H., Castano A.R., Segelke B.W., Stura E.A. Peterson P.A. y Wilson I.A. (1997) Crystal structure of mouse CD1: an MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277: 339-345.
- 65 Zhang S., Graeber L.A., Helling F., Ragupathi G., Adluri S., Lloyd K. O. y col., (1996) Augmenting the immunogenicity of synthetic MUC1 peptide vaccines in mice. *Cancer Res.* 56: 3315-3319.

Zhao-Emonet y col., "The equine herpes virus 4 thymidine kinase is a better suicide gene than the human herpes virus 1 thymidine kinase," *Gene Ther.* 6(9):1638-1642, 1999.

- 5 Zhu X., Zhao X., Burkholder W.F., Gragerov A., Ogata C.M., Gottesman M.E. y col., (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272: 1606-1614.

10 Todas las composiciones y procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden prepararse y ejecutarse sin excesiva experimentación en vista de la presente divulgación. Aunque las composiciones y procedimientos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para aquellos expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas del procedimiento descrito en el presente documento sin apartarse del concepto y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto químicamente como fisiológicamente relacionados pueden estar sustituidos con los agentes descritos en el presente documento mientras que se lograrían los mismos resultados o similares. Todos aquellos sustitutos y modificaciones similares evidentes para aquellos expertos en la materia se considera que están dentro del alcance y concepto de la invención como se describe en el presente documento.

20 1. Como una composición de materia, un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas.

2. Como una composición de materia, una composición que comprende un antígeno que incluye un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 3. Un procedimiento para estimular linfocitos T citotóxicos, que comprende la etapa de poner en contacto los linfocitos T citotóxicos con una cantidad de un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, en las que la cantidad es eficaz para estimular los linfocitos T citotóxicos.

4. El procedimiento de 3, en el que los linfocitos T citotóxicos se localizan dentro de un ser humano.

30 5. El procedimiento de 4, en el que el procedimiento comprende además la etapa de administrar al ser humano un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas

6. El procedimiento de 5, en el que el epítoto se formula para administración parenteralmente, tópicamente, o como un inhalante, aerosol o espray.

35 7. Un procedimiento de generación de una respuesta inmunitaria, que comprende la etapa de administrar a un ser humano una composición farmacéutica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que comprende un antígeno que comprende un epítoto de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas.

40 8. Un procedimiento de inducción de inmunidad contra un tumor en un individuo, que comprende las etapas de:

administrar al individuo un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas; y

45 administrar al individuo una vacuna contra el cáncer.

9. El procedimiento de 8, en el que el antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato se administra antes de la administración de la vacuna contra el cáncer.

50 10. El procedimiento de 8, en el que el antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato se administra posterior a la administración de la vacuna contra el cáncer.

11. El procedimiento de 8, en el que el antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato se administra tanto antes de como después de la administración de la vacuna contra el cáncer.

12. El procedimiento de 8, en el que la vacuna contra el cáncer comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 268 (E39) y SEC ID N°: 269 (E41).

55 13. Un procedimiento de inducción de linfocitos T citotóxicos de memoria en un individuo que comprende la etapa de administrar un antígeno que comprende un epítoto de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas.

14. El procedimiento de 13, en el que el individuo es sustancialmente susceptible a reparación del cáncer.

60 15. Un procedimiento de proporcionar inmunidad contra un tumor que comprende la etapa de administrar un antígeno que comprende una vacuna de epítoto de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas.

16. Un procedimiento para tratar un individuo para cáncer que comprende las etapas de:

administrar al individuo una primera vacuna contra el cáncer; y

65 administrar al individuo una segunda vacuna contra el cáncer que comprende un péptido de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación

de las mismas.

17. El procedimiento de 16, en el que la etapa de administración de la primera vacuna contra el cáncer precede a la etapa de administración de la segunda vacuna contra el cáncer.

5 18. El procedimiento de 16, en el que la etapa de administración de la primera vacuna contra el cáncer es posterior a la etapa de administración de la segunda vacuna contra el cáncer.

19. Una composición farmacéutica que comprende un antígeno que comprende un epítotope de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 20. Un procedimiento para tratar un trastorno de células proliferativas en un ser humano, que comprende administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un antígeno que comprende un epítotope de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 21. El procedimiento de 20, en el que el trastorno de células proliferativas es cáncer.

22. El procedimiento de 21, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer renal, melanoma, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer cerebral, sarcomas, o una combinación de los mismos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas.
- 10
2. Una composición que comprende un antígeno que incluye un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15
3. Un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, para su uso en un procedimiento para estimular linfocitos T citotóxicos, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto los linfocitos T citotóxicos con una cantidad del antígeno, en el que la cantidad es eficaz para estimular los linfocitos T citotóxicos.
- 20
4. El antígeno de la reivindicación 3, en el que los linfocitos T citotóxicos se localizan dentro de un ser humano.
- 25
5. El antígeno de la reivindicación 4, en el que el procedimiento comprende además la etapa de administrar al ser humano un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, particularmente en el que el epítoto se formula para administración parenteralmente, tópicamente, o como un inhalante, aerosol o espray.
- 30
6. Una composición que comprende un antígeno que comprende un epítoto de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmunitaria, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar a un ser humano una composición farmacéutica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición.
- 35
7. Un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, para su uso en un procedimiento de inducción de inmunidad contra un tumor en un individuo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 40
- administrar al individuo el antígeno; y
administrar al individuo una vacuna contra el cáncer.
- 45
8. El antígeno de la reivindicación 7, en el que el antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato se administra antes de la administración de la vacuna contra el cáncer y/o posterior a la administración de la vacuna contra el cáncer o en el que la vacuna contra el cáncer comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 268 (E39) y SEC ID N°: 269 (residuos de aminoácidos 245-253 de la proteína de unión a folato denominada E41).
- 50
9. Un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, para su uso en un procedimiento de inducción de linfocitos T citotóxicos de memoria en un individuo que comprende la etapa de administrar el antígeno.
- 55
10. El antígeno de la reivindicación 9, en el que el individuo es sustancialmente susceptible a reaparición del cáncer.
- 60
11. Una vacuna que comprende un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, para su uso en un procedimiento de proporcionar inmunidad contra un tumor que comprende la etapa de administrar el antígeno.
- 65
12. Una segunda vacuna contra el cáncer que comprende un péptido de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas para su uso en un procedimiento para tratar un individuo para cáncer que comprende las etapas de:
- administrar al individuo una primera vacuna contra el cáncer; y
administrar al individuo la segunda vacuna contra el cáncer.
13. La vacuna contra el cáncer de la reivindicación 12, en el que la etapa de administración de la primera vacuna contra el cáncer precede a la etapa de administración de la segunda vacuna contra el cáncer o es posterior a la etapa de administración de la segunda vacuna contra el cáncer.

5 14. Una composición farmacéutica que comprende un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 15. Una composición farmacéutica que comprende un antígeno que comprende un epítoto de proteína de unión a folato de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, o una combinación de las mismas, en un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno de células proliferativas en un ser humano, que comprende administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

15 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en el que el trastorno de células proliferativas es cáncer, particularmente en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer renal, melanoma, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer cerebral, sarcomas, o una combinación de los mismos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

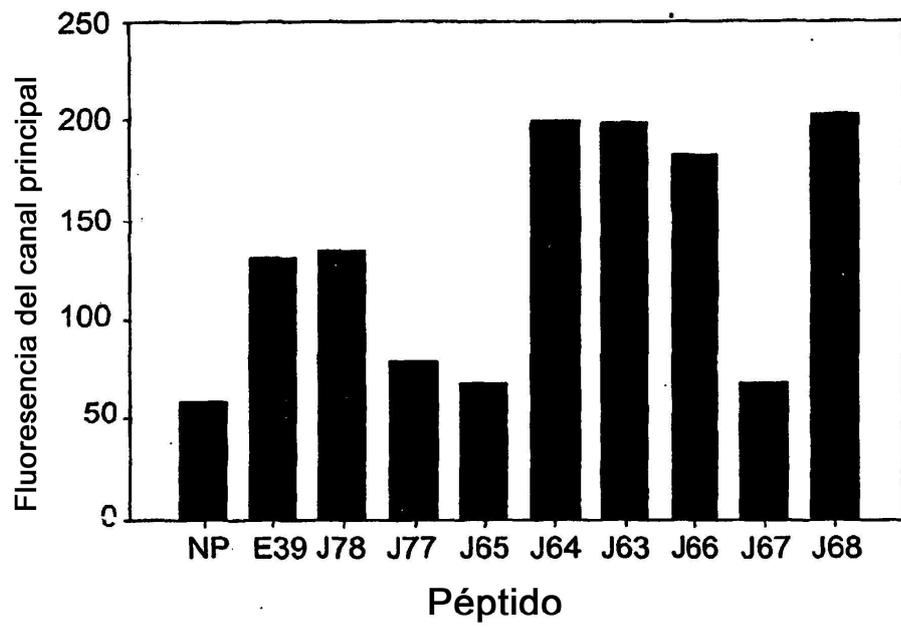


Figura 1

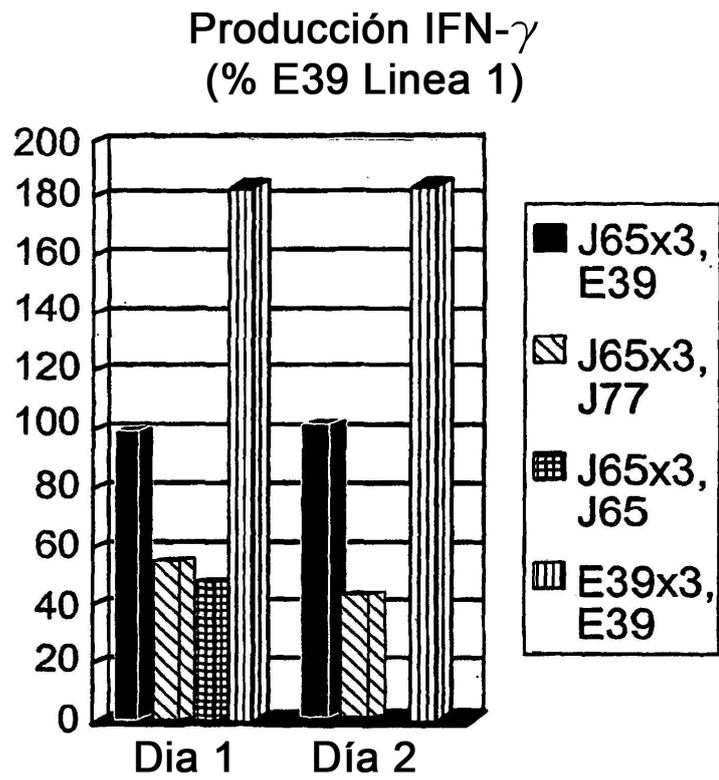


Figura 2A

Actividad CTL
E39 $\mu\text{g/mL}$
(% Lisis específica)

	0 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$
1. J65x3, E39	0	24.5	17.4
2. J65x3, J77	0	4.2	8.2
3. J65x3, J65	0	20.9	23.2
4. E39x3,E39	0	11.1	14.6

Figura 2B

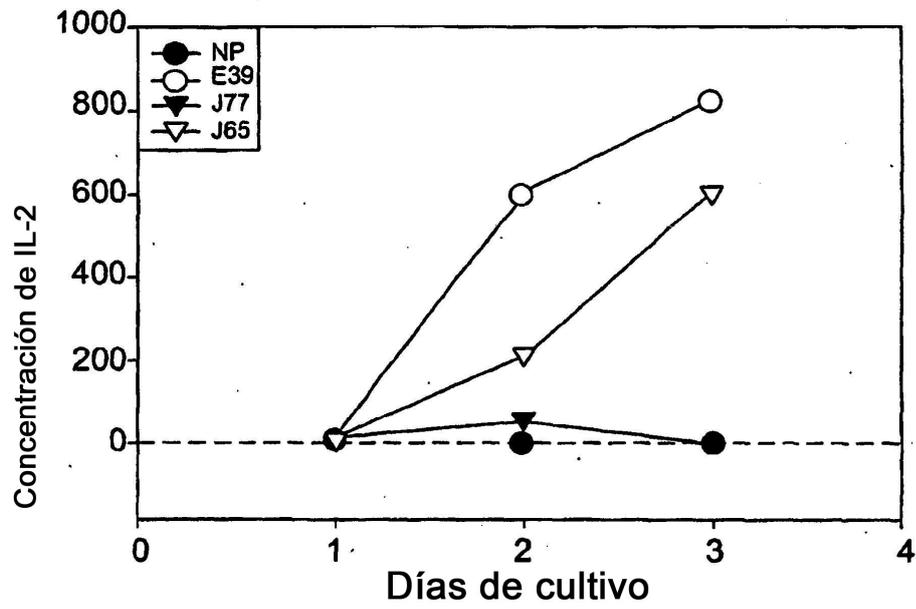


Figura 3

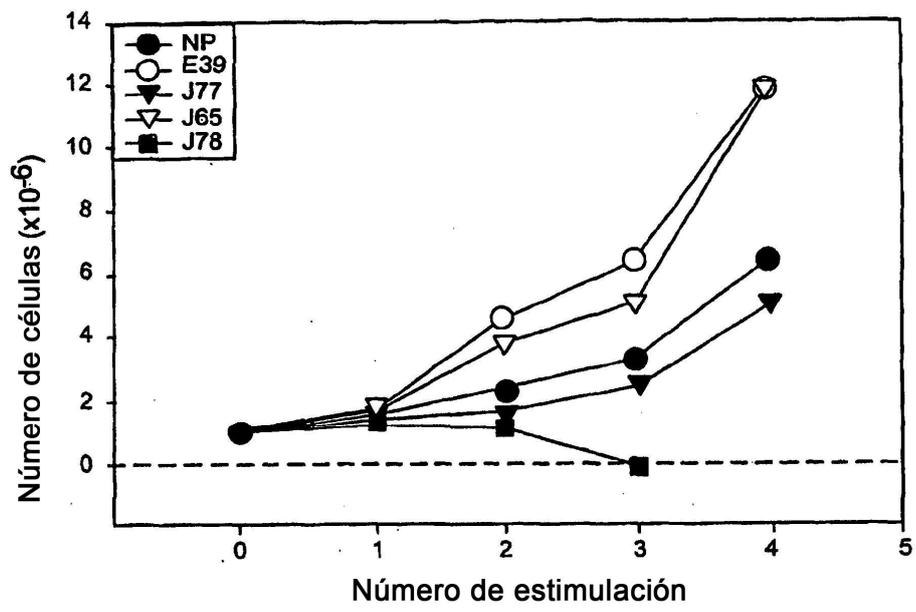


Figura 4

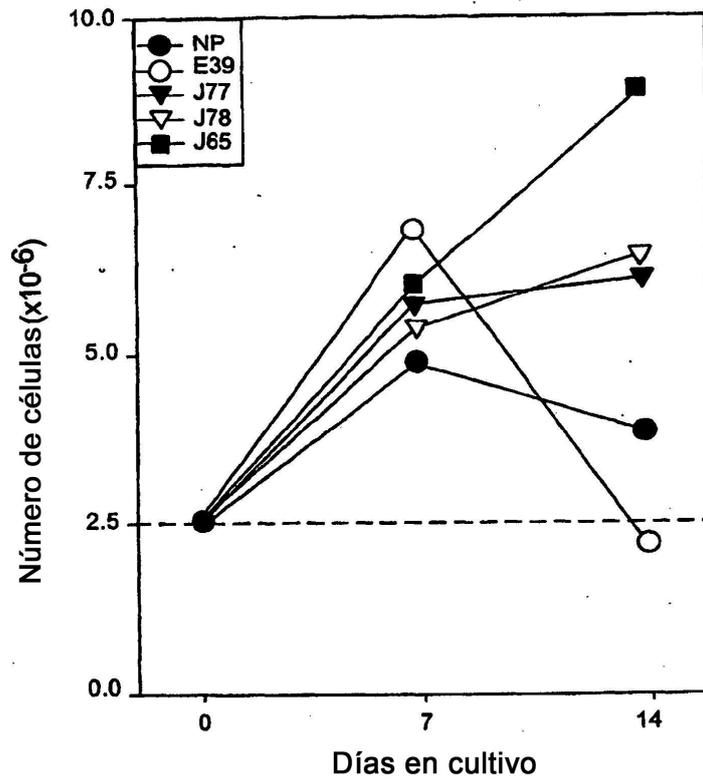


Figura 5