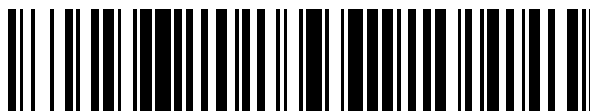


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 958**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2010** **E 10762452 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015** **EP 2416662**

54 Título: **Partículas de replicón de alfavirus que expresan TRP2**

30 Prioridad:

08.04.2009 US 167774 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2015

73 Titular/es:

ALPHAVAX, INC. (50.0%)
P.O. Box 110307 2 Triangle Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US y
SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER
RESEARCH (50.0%)

72 Inventor/es:

WOLCHOK, JEDD D.;
AVOGADRI, FRANCESCA;
OLMSTED, ROBERT A. y
MAUGHAN, MAUREEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 540 958 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

Partículas de replicón de alfavirus que expresan TRP2

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a tecnología de ADN recombinante, composiciones farmacéuticas para la profilaxis o tratamiento del cáncer, en particular, que comprenden partículas de replicón de alfavirus que contienen una secuencia codificadora expresable para un antígeno de melanoma de interés, y a métodos para desencadenar o aumentar una respuesta inmune frente a un antígeno de melanoma, especialmente dopacromo tautomerasa (DCT), que también se refiere como proteína relacionada con tirosinasa (TRP2), introduciendo ácido(s) nucleico(s) extraño(s) que codifican un antígeno de cáncer en una célula eucariota mediante partículas de replicón de alfavirus, y más particularmente, al uso de composiciones inmunogénicas que comprenden partículas de virus infecciosas, defectuosas en la propagación o partículas semejantes a virus, especialmente partículas de Virus de Encefalitis Venezolana que expresan TRP2, vacunas y aplicaciones en terapia de melanoma. En particular, la presente descripción proporciona preparaciones de partícula de replicón de alfavirus (ARP), especialmente partículas de VEE que expresan un antígeno de melanoma (en particular TRP2), para uso en medicina humana y veterinaria y para aumentar o inducir la respuesta del sistema inmune a este antígeno de manera que se reduce la incidencia, metástasis, y/o gravedad del melanoma.

El melanoma es una enfermedad especialmente devastadora, para la que no existe una vacuna aprobada para uso en terapia o para la prevención del melanoma. Ha habido un éxito relativamente limitado en los regímenes de vacuna de melanoma o usando composiciones inmunogénicas en el tratamiento de este cáncer si ha avanzado.

El género Alfavirus incluye una variedad de virus, todos los cuales son miembros de la familia Togaviridae. Los alfavirus incluyen el Virus de la Encefalitis Equina Oriental (EEE), Virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEE), Virus de Everglades, Virus Mucambo, Virus Pixuna, Virus de la Encefalitis Equina Occidental (WEE), Virus Sindbis, Virus del Bosque Semliki, entre otros. El genoma viral es un ARN monocatenario, con sentido de mensajero, modificado en el extremo 5' con una caperuza metilada y en el extremo 3' con un tracto poli (A) de longitud variable. Las subunidades estructurales que contienen una única proteína viral, cápside, se asocian con el genoma de ARN en una nucleocápside icosaédrica. En el virión, la cápside está rodeada por una cubierta lipídica cubierta con una matriz regular de puntas de proteína transmembrana, cada uno de los cuales consiste en un complejo heterodimérico de dos glicoproteínas, E1 y E2. Véase Pedersen et al., J. Virol 14: 40 (1974). Los virus Sindbis y del Bosque Semliki se consideran los alfavirus prototípicos y se han estudiado extensamente. Véase Schlesinger, The Togaviridae and Flaviviridae, Plenum Publishing Corp., Nueva York (1986). El virus VEE se ha estudiado extensamente, véase, por ejemplo la Patente U.S. No. 5.185.440.

Los estudios de estos virus han dado lugar al desarrollo de técnicas para la vacunación frente a enfermedades de alfavirus y frente a otras enfermedades mediante el uso de vectores de alfavirus para la introducción de genes extraños. Uno de dichos sistemas es el sistema del replicón de alfavirus, como se describe en la Patente U.S. No. 6.190.666 de Garoff et al., Patentes U.S. Nos. 5.792.462, 6.521.235 y 6.156.558 de Johnston et al., Patentes U.S. Nos. 5.814.482, 5.843.723, 5.789.245, 6.015.694, 6.105.686 y 6.376.236 de Dubensky et al.; Solicitud de Patente U.S. No. 6.767.699 (Polo et al.), Patentes U.S. Nos. 7.045.335, 7.425.337, y 7.442.381 (Smith et al. y Solicitud Publicada U.S. 2009-0075384 (Kamrud et al.). Las construcciones mejoradas, tanto auxiliares o auxiliares y replicón, para uso en la producción de partículas de replicón de alfavirus se describen en la Patente U.S. No. 7.045.335 (Smith et al.) y WO 2004/085660 (Smith et al.), y nuevos procesos para su fabricación se describen en la Patente U.S. No. 7.078.218 (Smith et al.). Los vectores y estrategias adicionales se describen en la Solicitud Publicada U.S. No. WO 2008/085557 y WO 2009/047255.

La publicación de Patente US No. 2006/0099587 proporciona composiciones inmunogénicas y métodos que pueden usarse para administrar vectores de alfavirus más seguros (es decir, atenuados) (tales como vectores de alfavirus que comprenden una capa de virión VEE) que retienen inmunogenicidad mejorada comparado con otros alfavirus atenuados. Goldberg S M et al (Clinical Cancer Research 20051115 US, vol. 11, no. 22, 15 noviembre 2005, páginas 8114-8121) compara dos vacunas de cáncer dirigidas a tirosinasa. Goldberg Stacie M et al (Proceedings Of The American Association For Cancer Research Annual Meeting, vol. 45, marzo 2004, página 288, y 95th Annual Meeting Of The American-Association-For-Cancer-Research; Orlando, FL, EEUU; marzo 27-31, 2004) describe la inmunización de determinados ratones con tumor con proteínas relacionadas con tirosinasa humanas 1 y 2. Yamanaka Ryuya et al (DNA And Cell Biology mayo 2005, vol. 24, no. 5, páginas 317-324) describe la construcción de un vector de expresión de ADN Sindbis y evalúa su potencial para la terapia de tumor cerebral. Leitner Wolfgang W et al (Nature Medicine, vol. 9, no. 1, enero 2003, páginas 33-39) describe una vacuna de ADN basada en alfavirus que activa las rutas antivirales innatas.

Permanece una necesidad en la técnica de métodos y composiciones para el tratamiento y profilaxis del melanoma, un cáncer especialmente agresivo y mortal que afecta a gran cantidad de personas cada año.

Resumen breve de la invención

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica para uso en el aumento o inducción de una respuesta inmune frente a células de melanoma en el sujeto; una composición inmunogénica; y una composición farmacéutica para uso en un método para reducir el riesgo de contraer melanoma en un sujeto humano o animal o reducir la gravedad o retrasar la progresión del melanoma en un sujeto humano o animal con melanoma, como se refleja en las reivindicaciones adjuntas. La presente descripción describe un método para aumentar una respuesta inmune a un antígeno de melanoma, en particular dopacromo tautomerasa (DCT, TRP2) en un sujeto humano o animal mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende partículas de replicón de alfavirus que expresan TRP2 o un fragmento efectivo de éste. En las presentes composiciones para uso y composiciones, el TRP2 es, de manera deseable, pero no necesariamente, idéntico en la fuente de especie a la del sujeto al que se administra la composición. En realizaciones específicas, el TRP2 de ratón tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Tabla 1 b y un TRP2 humano ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la presente memoria más adelante. Las secuencias codificadoras adicionales se proporcionan en la presente memoria más adelante, y en la técnica se conocen secuencias adicionales.

También se proporcionan en la presente memoria composiciones para uso en métodos para prevenir, reducir la probabilidad de desarrollar, reducir la gravedad del melanoma, reducir el tiempo hasta la progresión después de la intervención inicial o incrementar el tiempo de supervivencia después del diagnóstico del melanoma en un sujeto humano o animal que comprende administrar un fármaco que comprende una cantidad efectiva de partículas de replicón de alfavirus que expresan el antígeno de melanoma dopacromo tautomerasa (DCT, TRP2). La composición puede administrarse al sujeto de cualquier manera consistente con la administración de composiciones inmunogénicas, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal, intravaginal, intrarectal, subcutánea o intravenosa, especialmente mediante las rutas de administración subcutánea o intramuscular. En determinadas situaciones, especialmente para el tratamiento de prevención de melanoma metastásico, podría usarse la administración intravenosa. En un sujeto animal, la inyección en la almohadilla de la pata es otra ruta de administración para las presentes composiciones. En estos métodos, la administración se repite de manera deseable, aunque las dosificaciones posteriores del TRP2 pueden ser mediante una vacuna de ADN o proteína recombinante así como, o además de, las partículas de replicón de alfavirus que expresan TRP2, y cualquiera de las administraciones de TRP2 pueden ser alogénicas o singénicas respecto a la fuente de TRP2 y el sujeto.

Además, se proporciona una preparación inmunogénica que comprende una partícula de replicón de alfavirus que expresa un antígeno de melanoma dopacromo tautomerasa (DCT, TRP2), junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente componentes adicionales para proporcionar un adyuvante y/o un beneficio de liberación lenta y/o ingredientes para mejorar la estabilidad de almacenamiento o manejo durante o después de la liofilización tal como uno o más de sal, tensioactivo, agente de volumen, plastificante, y azúcar de enlace de hidrógeno u otro poliol.

En las composiciones y composiciones para uso descritas en la presente memoria, el alfavirus del que se obtienen las partículas de replicón de alfavirus puede ser virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEE), de manera deseable un virus VEE atenuado, que expresa TRP2 en el sujeto. El virus VEE u otras partículas de replicón de alfavirus (ARP) obtenidas de alfavirus también pueden prepararse por ingeniería para la producción de IL-12 u otra citoquina. Cuando hay ARP que expresan IL-12 administrados conjuntamente con la preparación ARP que expresa TRP2, la dosis del VRP que expresa TRP2 es, lo más preferiblemente, igual a o mayor que la dosis de las partículas de replicón de VEE que expresan IL-12.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1A es un diagrama del replicón TRP2 de VEE (ratón). Empezando en el promotor T7 y moviéndose en el sentido de las agujas del reloj, las flechas sólidas representan los cuatro genes de proteínas no estructurales virales VEE (nsP1-nsP4), el gen de TRP-2 murino y el gen de resistencia a kanamicina (KN^r), respectivamente. La Figura 1B es un diagrama de la construcción humana correspondiente.

La Figura 2 muestra los resultados de un experimento diseñado para determinar cuál de los antígenos de diferenciación de melanoma indicados funciona mejor cuando se administra mediante la expresión de VRP. Para este propósito, Grupos de 10 ratones se vacunaron según el esquema indicado, y se pulsaron i.d. con 7.5×10^4 células de melanoma B16 en el flanco derecho. El crecimiento tumoral se monitorizó cada dos-tres días durante 80 días. Se representó la supervivencia sin tumor. En dos experimentos independientes, observamos que VRP-TRP2 funciona significativamente mejor que VRP-tirosinasa y VRP-gp100. El 30% de los ratones tratados con VRP-TRP2 no tuvieron tumor incluso 80 días después del pulso.

La Figura 3 muestra los resultados de un experimento que determinó si la combinación de las tres preparaciones diferentes de VRP (VRP-tyr, VRP-gp100, VRP-TRP2) era más efectiva que usar VRP-TRP2 solo. Para este propósito, se vacunaron grupos de 15 ratones como se describe en la figura previa. Sorprendentemente, estos experimentos indicaron que, aunque la combinación de VRP-tirosinasa+VRP-gp100 tenía un efecto antitumoral significativamente mejor comparado con VRP-GFP, no fueron tan efectivas como VRP-TRP2 solo (panel de la

izquierda). Además, la combinación de los tres antígenos diferentes no incrementa la eficacia de VRP-TRP2 cuando se administra como un agente único (panel de la derecha).

La Figura 4 proporciona los resultados de un experimento representativo en el que se analizó la respuesta de células T CD8+ a la vacuna. Los ratones se trataron como se indica, con VRP-TRP2, VRP-GP100, el péptido inmunodominante TRP2 (TRP2-181) emulsionado en titermax (un adyuvante comercial), o se dejaron sin tratar. En la semana 5 las células T CD8+ se purificaron del bazo y se re-estimularon con péptido gp100-15, el péptido TRP2-181, células B16 irradiadas o no se re-estimularon (n.r.). Las células T CD8+ que secretan IFN γ se analizaron usando el ensayo ELISPOT. Cada punto representa un ratón individual; también se indican la media y SEM. Estos experimentos indican que VRP-TRP2 puede inducir células T CD8+ específicas para el epítipo 181 y que estas células T CD8+ pueden reconocer células B16. VRP-gp100 es también capaz de activar células T CD8+ específicas de gp-100, pero estas células son incapaces de reconocer células B16. Las respuestas de células T CD8 específicas de tumor inducidas por VRP-TRP2 son significativamente mayores que las inducidas por VRP-gp100.

La Figura 5 muestra los resultados para el análisis de la respuesta de células B inducida por la vacuna. Los ratones se trataron como se muestra, y en la semana 5, se extrajeron los sueros de la sangre periférica y se analizaron por ELISA estándar. En el eje de las x se indica la dilución de los sueros (titulación). Cada símbolo representa un ratón individual. Este experimento es representativo de varias respuestas de anticuerpo inducidas por VRP-TRP2 específicas para TRP2.

La Figura 6A muestra los resultados para experimentos diseñados para revelar qué brazo de la respuesta inmune adaptativa es más relevante para mediar la protección tumoral en el modelo profiláctico. En este experimento, los ratones se vacunaron según el esquema mostrado, pero después de la última inmunización y antes de la inoculación del tumor, las células T CD8+ o CD4+ se deplecionaron mediante la administración de anticuerpos de depleción. Este experimento (representativo de dos) sugiere que el efecto anti-tumoral de la administración profiláctica de VRP-TRP2 no depende de las respuestas de células T CD8+ que es capaz de inducir.

La Figura 6B muestra los resultados para experimentos adicionales diseñados para analizar el papel de los linfocitos T y otras células inmunes en la mediación de la protección tumoral. Los ratones se vacunaron según el esquema mostrado, pero después de la última inmunización, las células T CD8+ y CD4+, o células Asesinas Naturales (NK) y T Asesinas Naturales (NKT), se deplecionaron mediante la administración de los anticuerpos de depleción apropiados durante un periodo de tiempo prolongado, tanto antes como después de la inoculación de células tumorales B16. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, se cree que este experimento (representativo de dos) muestra que el efecto anti-tumoral de VRP-TRP2 no depende de la inducción de células NK y NKT, pero que depende, al menos en parte, de la acción combinada de las células T CD8+ y CD4+ inducidas por la vacuna.

La Figura 6C muestra los resultados para experimentos adicionales diseñados para evaluar la contribución de los linfocitos T CD8+ y CD4+ y otras células inmunes en la mediación de la protección tumoral. Se vacunaron ratones de tipo salvaje (WT), deficientes en MHC I, o deficientes en MHC II (que carecen de linfocitos T CD4+) según el esquema mostrado, antes de la inoculación de células tumorales B16. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, se cree que la expresión de MHC II es necesaria para el efecto anti-tumoral de VRP-TRP2. Por el contrario, la ausencia de MHC I disminuye el efecto anti-tumoral de la vacuna pero no lo elimina completamente.

La Figura 6D muestra los resultados para experimentos diseñados para revelar el papel de las IgG en la mediación de la protección tumoral. Se vacunaron grupos de ratones tres veces con dos semanas de diferencia con VRP que codifica GFP, TRP2, gp100 o tyr. Una semana después de la última inmunización, los ratones se sangraron para obtener suero que contiene IgG. Los sueros se transfirieron a animales receptores que se inocularon con células tumorales B16. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, se cree que los sueros que contienen IgG anti-TRP2 incitados por la vacuna VRP-TRP2 tienen propiedades anti-tumorales.

La Figura 6E muestra resultados adicionales para experimentos diseñados para revelar el papel de las IgG en la mediación de la protección tumoral. Se vacunaron ratones deficientes en el receptor de la cadena gamma común Fc (Fc γ R-/-) antes de la inoculación con células tumorales B16. Se usaron compañeros de camada control que eran animales heterocigotos para las delecciones (Fc γ R+/-). Este experimento indica que la expresión de Fc γ R es un requerimiento importante para conseguir un efecto anti-tumoral potente.

La Figura 7 muestra los resultados de experimentos diseñados para evaluar la eficacia de VRP-TRP2 en un entorno terapéutico, en el que la inyección de los VRP empezó un día después del pulso intradérmico con células de melanoma B16 (modelo de piel). Los ratones y los tumores se analizan como se describe.

La Figura 8 muestra los resultados de un experimento para examinar la eficacia de VRP-TRP2 en un modelo de tratamiento en el que se inyectaron células B16 intravenosamente (i.v.). Después de la inyección i.v., las células B16 crecen principalmente en el pulmón, donde forman rápidamente nódulos (modelo de pulmón). Típicamente, 20 a 30 días después de la inyección i.v. de células B16, los ratones mueren con grandes masas tumorales en los pulmones. Los ratones se pulsaron en primer lugar i.v. con células B16 y se trataron con VRP-TRP2 como se indica. 24 días después del pulso tumoral, los ratones se sacrificaron, y los pulmones se analizaron para la presencia de nódulos pulmonares. Se analizaron 9-10 ratones por grupo; se reporta el peso pulmonar y se toman imágenes de ejemplos

representativos. Los ratones tratados con VRP-GFP control (antígeno irrelevante) tenían tumores muy grandes en los pulmones; por el contrario, los ratones tratados con VRP-TRP2 no tenían tumores o tenían pocos nódulos superficiales muy pequeños.

La Figura 9 muestra la eficacia de VRP-TRP2 en un modelo de tratamiento en el que se inyectaron células B16 intradérmicamente, y los tratamientos empezaron a diferentes puntos de tiempo después de la inyección de células B16 (modelo de piel, curso de tiempo). Se reporta la supervivencia sin tumor. Grupos de 15 ratones se dejaron sin tratar (sin tratar), se trataron con VRP-GFP semanalmente desde el día 1, o se trataron con VRP-TRP2 semanalmente empezando desde el día 1, día 3 o día 5. Este experimento se hizo para evaluar cómo de tarde podría empezarse el tratamiento y todavía proporcionar un efecto anti-tumoral significativo. En la gráfica se reporta la supervivencia sin tumor. Cada grupo de tratamiento tenía 10 ratones, $p = 0,01$.

La Figura 10 presenta los resultados de un experimento diseñado para caracterizar el infiltrado tumoral después de la vacunación con VRP-TRP2, proporcionando de esta manera un análisis *in vivo* de la reacción inmune incitada por la vacuna. Las células tumorales B16 se inocularon en ratones que se habían vacunado previamente con el VRP indicado, o se dejaron sin tratar (sin tratar). Siete días después de la inoculación de células tumorales B16, se reseccionaron las masas tumorales y se procesaron para análisis citométrico de flujo. Panel (a); Imagen representativa de las masas tumorales después de la resección; Panel (b) Distribuciones de puntos representativas que ilustran la estrategia citométrica de flujo utilizada para el análisis; Panel (c) Cuantificación de la población indicada de los tipos de células inmunes que se infiltran en el tumor (representativo de 4-5 ratones por grupo analizado).

Descripción detallada de la invención

Existe una necesidad en la técnica para composiciones farmacéuticas rentables, potentes y eficaces para el tratamiento de un cáncer devastador tal como melanoma y/o para reducir la incidencia, metástasis y/o gravedad de un cáncer tal como melanoma y para incrementar el tiempo de supervivencia después del inicio del melanoma. En la presente memoria se describe un sistema de vector replicón de ARN derivado de un alfavirus atenuado preparado por ingeniería para producir partícula de replicón de alfavirus (ARP) semejante a virus de único ciclo, defectuosa en la propagación que contiene un ARN auto-replicante (replicón) que expresa el antígeno de melanoma dopacromo tautomerasa (DCT, también conocido como TRP2). Cuando se inocula en seres humanos y/o animales, estas composiciones de ARP aumentan o inducen significativamente las respuestas inmunes humoral y celular frente a células de melanoma, células de melanoma metastásicas y tumores. Es particularmente importante generar una respuesta rápida y fuerte frente a las células de melanoma y tumores con el fin de incrementar el tiempo de supervivencia después del diagnóstico, retrasar la recurrencia, reducir la gravedad del cáncer y sus efectos, y/o reducir la intensidad y aparición de este cáncer y sus efectos, que es notoriamente difícil de tratar, especialmente si está avanzado. Además, la administración de dichas composiciones a sujetos que todavía no tienen melanoma, por ejemplo, aquellos sujetos que pueden presentar riesgo alto de desarrollar melanoma, previene o reduce la incidencia y/o gravedad del melanoma.

Los protocolos de inmunización pueden tener administraciones repetidas o administraciones únicas, y una segunda o posterior dosis puede ser de una especie diferente de TRP2 y/o puede comprender una modalidad diferente o una modalidad adicional que la dosificación de VRP-TRP2 inicial. Las dosis posteriores también pueden ser de una cantidad diferente, bien más o menos, que la dosis inicial administrada.

Los antígenos de diferenciación de melanocitos son candidatos atractivos para la inmunoterapia de melanoma, pero debido a que se expresan por células malignas así como su equivalente normal la incitación de respuestas inmunes efectivas es un reto.

En la presente memoria se describe el uso de un sistema de vector de replicón de alfavirus como una inmunoterapia para prevenir o tratar melanoma y otros cánceres que expresan TRP2. El uso de partículas de replicón semejantes a virus (VRP) defectuosas en la propagación basadas en una cepa atenuada de virus de encefalitis equina venezolana (VEE) es especialmente atractivo porque VRP expresa proteínas heterólogas a altos niveles y dirige la expresión a células dendríticas. Se ha mostrado que las vacunas de VRP incitan respuestas inmunes tanto humorales como celulares a los productos génicos en vectores en muchos modelos de enfermedad animal y en ensayos clínicos de fase I/II.

La proteína inmunogénica puede ser una proteína TRP2 dopacromo tautomerasa (DCT, TRP2) de longitud completa o un fragmento inmunogénico de ésta. En el ácido nucleico de la partícula de replicón de alfavirus, el TRP2 puede ser de la misma especie que la del que se administra la composición inmunogénica que comprende las partículas de replicón de alfavirus (administración singénica) o puede ser de una especie diferente (administración alogénica). Una proteína TRP2 que varía en secuencia de la del sujeto pero que deriva de la misma especie que la del sujeto también puede expresarse por la composición VRP.

Las eficacias de las composiciones VEE VRP que expresan los antígenos de diferenciación de melanocitos tirosinasa, gp100 o TRP-2 se analizaron frente a pulso con células del melanoma murino B16 poco inmunogénico y altamente agresivo. VRP que expresan TRP-2 fueron los más efectivos en retrasar la aparición de tumor cuando se

compara con los demás antígenos ensayados. Aunque se inducen tanto células T CD8+ específicas de TRP2 como IgG específicas de TRP2, los datos sugieren que las células B pueden jugar un papel más importante en la fase efectora de la protección tumoral, al menos en la estrategia profiláctica. Estos estudios demuestran que las vacunas VRP presentan una estrategia útil para la inmunoterapia y profilaxis del melanoma.

5 Un aspecto de las composiciones para uso y composiciones proporcionadas en la presente memoria es la capacidad sorprendente de la respuesta inmune TRP2 frente a células de melanoma, con el resultado de que en los modelos de ratón de B16, existe una regresión tumoral significativa y supervivencia prolongada en ratones tratados después del desarrollo del tumor y desarrollo tumoral pospuesto o ausencia de tumor en ratones pulsados con las células de melanoma B16 después de vacunación con los ARP que expresan TRP2. Sin pretender la vinculación a ninguna
10 teoría, se cree que la administración de los ARP que expresan TRP2 aumentaron la magnitud de las respuestas humoral, o de anticuerpo, frente a las células de melanoma así como la respuesta de células T frente a estas células. Se consigue un beneficio similar en seres humanos que padecen melanoma o en seres humanos en los que se desea protección frente a melanoma.

15 El papel para la inducción de las respuestas humores por ARP que expresan TRP2 está apoyado por la observación de que los sueros de ratones inmunizados con ARP que expresa TRP2 retrasó el crecimiento tumoral comparado con los sueros de ratones inmunizados con ARP que expresan otros antígenos. La inducción de IgG específicas de TRP-2 depende de MHC II, y el efecto anti-tumoral implica la señalización a través de receptores Fc activadores.

20 La inmunización con ARP que expresan TRP2 indujo una respuesta de células T CD8+ más fuerte frente al epítipo inmunodominante TRP-2₁₈₁ comparado con la respuesta incitada por VRP que expresan otros antígenos de diferenciación de melanocitos. Además, la inmunización con ARP que expresan TRP-2 incrementó significativamente el porcentaje de células inmunes CD45+ infiltrantes en el infiltrado de tumores implantados después de la vacunación, y la cualidad de la respuesta CD45+ se cambió, ya que el porcentaje de células T CD3+CD8+ reclutadas en el sitio tumoral se aumentó significativamente, indicando que las células T CD8+ reactivas
25 frente a las células tumorales B16 estaban moviéndose al tumor *in vivo*.

Dicha activación sinérgica de mecanismos efectores tanto de IgG como células T CD8+ apoya la eficacia particular de los ARP que expresan TRP-2.

Se entiende que la estrategia de inmunización descrita en la presente memoria puede combinarse con cirugía y/o estrategias quimioterapéuticas en el tratamiento de un melanoma diagnosticado.

30 En determinadas realizaciones, los presentes métodos se llevan a la práctica como parte de una estrategia de inmunización cebado-refuerzo heteróloga, en la que la inmunización por "cebado", que comprende la administración inicial de uno o más antígenos a un animal, especialmente un paciente humano, en una forma (o "modalidad") en la preparación para administración o administraciones posteriores (referido frecuentemente como "refuerzo") del mismo antígeno en una forma diferente, o modalidad. Específicamente, el término "cebar", o alternativamente "iniciar" o
35 "activar" una respuesta inmune o "aumentar" y "potenciar", define una primera administración de inmunización que administra un antígeno que induce una respuesta inmune frente al antígeno deseado y recuerda un nivel mayor de respuesta inmune frente al antígeno deseado después de re-inmunización posterior con el mismo antígeno cuando se administra en el contexto de un sistema de administración de vacuna diferente (es decir, forma o modalidad). Las formas de antígeno que se van a administrar pueden comprender vectores de alfavirus, inmunógenos derivados de células de melanoma cultivadas u otras células de melanoma o del tumor relevante, por ejemplo del sujeto si padece
40 melanoma, proteína TRP2 recombinante, péptidos sintéticos que comprenden al menos un epítipo de TRP2, organismos vivos, atenuados o muertos o extractos en los que se expresa el antígeno TRP2, ácidos nucleicos desnudos, ácidos nucleicos formulados con restos que contienen lípidos, vectores pox, vectores adenovirales, vectores del virus del herpes, vectores flavivirus, vectores de virus de la estomatitis vesicular, vectores paramixovirales, vectores parvovirus, vectores papovavirus, y vectores retrovirales, en los que un ácido nucleico o vector expresa el antígeno TRP2 en células del sujeto en el que se administra. Los vectores virales pueden ser partículas semejantes a virus o ácidos nucleicos virales capaces de expresar el antígeno TRP2. En las composiciones para uso descrito en la presente memoria, la etapa de cebado es la administración de una composición que comprende el ARP que expresa TRP2. Después de la inmunización de cebado, se administra una
50 "inmunización de refuerzo", o un "refuerzo", una composición que administra el mismo antígeno codificado como en la inmunización de cebado. El refuerzo se refiere algunas veces como una respuesta anamnésica, es decir, una respuesta inmune en un animal previamente sensibilizado. Pueden administrarse refuerzos múltiples, utilizando cantidades diferentes o iguales para cada refuerzo. Pueden administrarse adyuvantes y/o citoquinas junto con la composición inmunogénica.

55 Como ilustración de la necesidad de mejoras en la profilaxis y/o tratamiento de melanoma, más de 60.000 americanos son diagnosticados con melanoma cada año, y esta enfermedad causa más de 8.000 muertes por año (National Cancer Institute, 2008). El melanoma es una enfermedad especialmente grave, especialmente si no se detecta y trata pronto en la progresión de la enfermedad, al menos en parte porque el melanoma no tratado frecuentemente metastatiza agresivamente. Además, el melanoma frecuentemente no responde bien a regímenes
60 quimioterapéuticos.

Los ARP que expresan TRP2 sirven como inmunógenos útiles en regímenes de tratamiento y/o vacunación para reducir la incidencia de melanoma y/o para mejorar el estado clínico del sujeto o retardar el proceso de la enfermedad de melanoma. Con el fin de determinar si los ARP diseñados para expresar TRP2 podrían servir como agentes de administración funcionales que aumentan la inmunidad, la secuencia codificadora que codifica TRP2 se clonó en el plásmido de ADN replicón ARP, y los ARN transcritos se empaquetaron en VRP. Los procedimientos usados en la presente memoria para preparar VRP que expresan TRP2, que se basan en un sistema auxiliar de replicón, se describen con detalle en las Patentes U.S. Nos. 7.078.218, 7.045.335, 7.425.337, 7.442.381 y la Solicitud Publicada U.S. 2009-0075384. Se inmunizaron ratones con composiciones inmunogénicas que contienen VRP que expresan el antígeno de melanoma TRP2. Los ratones se monitorizaron para respuestas humorales frente al antígeno, y se midieron las respuestas celulares en bazo obtenidos por necropsia realizados al final de los estudios. Sorprendentemente, los VRP que expresan TRP2 fueron particularmente potentes para inducir no sólo respuestas celulares sino también humorales activas frente a las células de tumor de melanoma. No pareció que se requiriera un tipo de antígeno o anticuerpo adicional para generar un efecto beneficioso en este modelo de melanoma de ratón para enfermedad humana.

En general, las vacunas de VRP dirigen la expresión del gen de interés al nódulo linfático drenante, que también es el sitio en el que se produce la presentación del antígeno a células T sin estimular. Experimentos previos de PCR con VRPS que expresan una proteína de interés han mostrado que la expresión de VRP del gen de interés continúa durante unos pocos días hasta que sucumbe la célula que expresa. Mientras la proteína soluble desaparece rápidamente por degradación así como difusión, la expresión mediada por VRP, por otra parte, es transitoria y como no hay estadio de ADN en el ciclo del replicón de alfavirus, no hay riesgo de integración.

La dosis óptima para un sujeto dado y una diana de enfermedad dada se determina fácilmente tomando como base las enseñanzas de la presente memoria. Puede ensayarse un intervalo de ARP que expresan TRP2, en un intervalo de dosificación de 10^4 a 10^{11} , opcionalmente 10^7 a 10^{10} , especialmente 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 ó 10^{10} . La dosis óptima para aumentar las respuestas celulares puede no ser siempre la dosis óptima para aumentar las respuestas humorales; si se desean ambas respuestas, puede ser ventajoso ensayar varias concentraciones de TRP2-ARP en el intervalo dado para determinar la respuesta inmune global óptima.

La discusión siguiente se proporciona para mejorar la comprensión de la presente descripción por un experto en la técnica en la técnica relevante.

En el contexto de la presente solicitud, nm significa nanometro, mL significa mililitro, VEE significa Virus de la Encefalitis Equina Venezolana, EMC significa Virus de la Encefalomiocarditis, BHK significa células de riñón de cría de hámster, HA significa gen de hemaglutinina, GFP significa gen de la proteína verde fluorescente, N significa nucleocápside, FACS significa separador celular activado por fluorescencia, IRES significa sitio de entrada al ribosoma interno, pfu significa unidades formadoras de placa, iu significa unidades infecciosas, y FBS significa Suero Fetal Bovino. La expresión "número de aminoácido de E2 (por ejemplo, Lys, Thr, etc.)" indica aminoácidos designados en el residuo designado de la proteína E2, y también se usa para hacer referencia a aminoácidos en residuos específicos en las proteínas E3 o E1. TRP2 se refiere a dopacromo tautomerasa (también conocido como el locus "slaty", DCL o TRP2/DCL).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "alfavirus" tiene su significado convencional en la técnica, e incluye las diferentes especies tales como Virus VEE, Virus del Bosque Semliki (SFV), Sindbis, Virus del Rio Ross, Virus de la Encefalitis Equina Occidental, Virus de la Encefalitis Equina Oriental, Virus Chikungunya, S.A. AR86, Virus Everglades, Virus Mucambo, Virus del Bosque Barmah, Virus Middleburg, Virus Pixuna, Virus O'nyong-nyong, Virus Getah, Virus Sagiyama, Virus Bebaru, Virus Mayaro, Virus Una, Virus Aura, Virus Whataroa, Virus Banbanki, Virus Kyzylagach, Virus J Highlands, Virus Fort Morgan, Virus Ndumu, y Virus Buggy Creek. Los alfavirus útiles en las construcciones y métodos descritos en la presente memoria son VEE, S.A. AR86, Sindbis (por ejemplo, TR339, véase la Patente U.S. No. 6.008.035), y SFV. Véase también WO 2008/058035 y WO 2008/085557.

Los términos "secuencia de reconocimiento de la replicación de alfavirus 5'" y "secuencia de reconocimiento de la replicación de alfavirus 3'" se refieren a las secuencias encontradas en los alfavirus, o secuencias derivadas de ellos, que son reconocidas por las proteínas replicasas de alfavirus no estructurales y dan lugar a la replicación del ARN viral. Éstas se refieren algunas veces como los extremos 5' y 3', o secuencias de alfavirus 5' y 3'. El uso de estos extremos 5' y 3' resulta en la replicación de la secuencia de ARN codificada entre los dos extremos. La secuencia de reconocimiento de la replicación de alfavirus 3' como se encuentra en el alfavirus tiene típicamente una longitud de aproximadamente 300 nucleótidos, que contiene una secuencia de reconocimiento de la replicación 3' mínima, mejor definida. La secuencia de reconocimiento de replicación 3' mínima, conservada entre los alfavirus, es una secuencia de 19 nucleótidos (Hill et al., J. Virology, 2693-2704, 1997). Estas secuencias pueden modificarse por técnicas de biología molecular estándar para minimizar adicionalmente el potencial de recombinación o para introducir sitios de clonación, con la condición de que deben ser reconocidas por la maquinaria de replicación del alfavirus.

El término "secuencia de reconocimiento de la replicación de alfavirus 5' mínima" se refiere a la secuencia mínima que permite el reconocimiento por las proteínas no estructurales del alfavirus pero no resulta en empaquetamiento/recombinación significativo de moléculas de ARN que contienen la secuencia. En una realización preferida, la secuencia de reconocimiento de la replicación de alfavirus 5' mínima resulta en una disminución del

cincuenta a cien veces en la frecuencia observada de empaquetamiento/recombinación del ARN que contiene la secuencia. El empaquetamiento/recombinación de auxiliares puede evaluarse por varios métodos, por ejemplo, el método descrito por Lu y Silver (J. Virol. Methods 2001, 91 (1): 59-65).

Los términos "replicón de ARN de alfavirus", "ARN replicón de alfavirus", "replicón de vector de ARN de alfavirus", y "ARN replicón de vector" se usan indistintamente para hacer referencia a una molécula de ARN que expresa genes de proteínas no estructurales de manera que puede dirigir su propia replicación (amplificación) y comprende, como mínimo, secuencias de reconocimiento de la replicación de alfavirus 5' y 3' (que pueden ser secuencias mínimas, como se ha definido anteriormente, pero pueden ser alternativamente las regiones completas del alfavirus), secuencias codificadoras para proteínas no estructurales de alfavirus, y un tracto de poliadenilación. Puede contener además uno o más elementos para dirigir la expresión, lo que significa transcripción y traducción, de una secuencia de ARN heteróloga. También puede prepararse por ingeniería para expresar proteínas estructurales de alfavirus. Johnston et al., Polo et al. (como se cita en los antecedentes), y Smith et al. (Patentes U.S. Nos. 7.045.335, 7.078.218, 7.425.337 y 7.442.381) describen numerosas construcciones para dichos replicones de ARN de alfavirus. Las realizaciones específicas de los replicones de ARN de alfavirus pueden contener una o más mutaciones atenuantes, siendo una mutación atenuante una delección de nucleótido, adición, o sustitución de uno o más nucleótido(s), o una mutación que comprende la reorganización o construcción quimérica que resulta en una pérdida de virulencia en un virus vivo que contiene la mutación comparado con el alfavirus de tipo salvaje apropiado. Los ejemplos de una sustitución de nucleótido atenuante (que resulta en un cambio de aminoácido en el replicón) incluye una mutación en la posición de aminoácido 538 de nsP1, posición de aminoácido 96 de nsP2, o posición de aminoácido 372 de nsP2 en el alfavirus S.A.AR86, y un ejemplo de una mutación atenuante en la región no codificadora del ácido nucleico del replicón es la sustitución de A o C en el nucleótido 3 en VEE.

Los términos "proteína/proteína(s) estructurales de alfavirus" se refieren a una o una combinación de las proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Éstas son producidas por el virus como una poliproteína y se representan generalmente en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte en la membrana para las dos glicoproteínas, E2 y E1. Así, el uso del término E1 en la presente memoria puede referirse a E1, E3-E1, 6k-E1, o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en la presente memoria puede referirse a E2, E3-E2, 6k-E2, o E3-6k-E2. Las mutaciones atenuantes pueden introducirse en una cualquiera o más de las proteínas estructurales de alfavirus.

El término "auxiliar(es)" o "construcción o construcciones auxiliares", se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus. Johnston et al., Polo et al. (como se cita en los antecedentes), Smith et al. (Patente U.S. No. 7.045.335 y 7.078.218) y Kamrud et al. (Solicitud Publicada U.S. 2009-0075384) describen numerosas construcciones auxiliares útiles para expresar proteínas estructurales de alfavirus en la producción de ARP.

Los términos "célula auxiliar" y "célula de empaquetamiento" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a la célula en la que se producen las partículas de replicón de alfavirus. La célula auxiliar comprende un conjunto de auxiliares que codifican una o más proteínas estructurales de alfavirus. Como se describe en la presente memoria, los auxiliares pueden ser ARN o ADN. La célula puede ser cualquier célula que es permisiva para alfavirus, es decir, células que son capaces de producir partículas de alfavirus después de la introducción de un transcrito de ARN viral. Las células permisivas para alfavirus incluyen, pero no están limitadas a, células Vero, de riñón de cría de hámster (BHK), 293, 293T, fibroblasto de embrión de pollo (CEF), y de ovario de hámster chino (CHO). En determinadas realizaciones, la célula auxiliar o de empaquetamiento puede incluir además una ARN polimerasa dependiente de ARN heteróloga y/o una proteasa específica de secuencia. Los ácidos nucleicos que codifican proteínas estructurales de alfavirus pueden estar presentes en la célula auxiliar de forma transitoria o por integración estable en el genoma de la célula auxiliar. El ácido nucleico que codifica las proteínas estructurales de alfavirus que se usan para producir partículas de alfavirus puede estar bajo el control de promotores constitutivos y/o inducibles. En una realización, las secuencias que codifican proteínas estructurales de alfavirus pueden proporcionarse en un único auxiliar de ADN (véase Smith et al. Patente U.S. No. 7.045.335) o como dos construcciones auxiliares que comprenden un elemento IRES en el que la traducción de estas secuencias codificadoras puede estar controlada por la actividad de un elemento IRES. En dichas realizaciones, el elemento IRES puede ser activo en el tipo de célula auxiliar específico y no activo, o mínimamente activo en otros tipos de células. En realizaciones particulares, las células auxiliares comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas estructurales de alfavirus en una combinación y/o cantidad suficiente para producir una partícula de alfavirus cuando el ácido nucleico replicón recombinante se introduce en la célula bajo condiciones mediante las cuales se producen las proteínas estructurales de alfavirus y el ácido nucleico replicón recombinante se empaqueta en partículas de alfavirus descritas en la presente memoria.

Los términos "partículas de replicón de alfavirus", "partículas de replicón de virus" o "partículas de alfavirus recombinantes", usados indistintamente en la presente memoria, significan un complejo estructural semejante a virión que incorpora un ARN de replicón de alfavirus que expresa una o más secuencias de ARN heterólogas. Típicamente, el complejo estructural semejante a virión incluye una o más proteínas estructurales de alfavirus incluidas en una cubierta lipídica que encierra una nucleocápside que a su vez encierra el ARN. La cubierta lipídica deriva típicamente de la membrana plasmática de la célula en la que se producen las partículas. Preferiblemente, el ARN de replicón de alfavirus está rodeado por una estructura de nucleocápside comprendida por la proteína de la

cápside del alfavirus, y las glicoproteínas del alfavirus están incluidas en la cubierta lipídica derivada de la célula. Las proteínas estructurales y el ARN replicón pueden derivar de los mismos alfavirus o de alfavirus diferentes. En una realización específica, el ARN replicón y las proteínas estructurales son de VEE, por ejemplo, véase Rayner et al., Publicación de Patente U.S. 2005-0266550. En otra realización, el ARN replicón deriva de VEE y las proteínas estructurales derivan de Virus Sindbis (véase, por ejemplo, Dubensky et al., Patente U.S. No. 6.376.236). Las partículas de replicón de alfavirus son infecciosas pero defectuosas en la propagación, es decir, el ARN replicón no puede propagarse más allá de la célula huésped que infectan inicialmente las partículas, en ausencia del o de los ácidos nucleicos auxiliares que codifican las proteínas estructurales del alfavirus.

Se emplea un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir de ADN, es decir, una ARN polimerasa dependiente de ADN, para producir los ácidos nucleicos de replicón de alfavirus y auxiliares proporcionados en la presente memoria. En el presente contexto, un promotor es una secuencia de nucleótidos reconocida por una polimerasa y suficiente para causar la transcripción de una secuencia asociada (en 3'). En algunas realizaciones, el promotor es constitutivo (véase más adelante). Alternativamente, el promotor puede estar regulado, es decir, no actúa constitutivamente para causar la transcripción de la secuencia asociada. Si es inducible, hay secuencias presentes que median la regulación de la expresión de manera que la secuencia asociada se transcribe sólo cuando (i) está presente una molécula inductora en el medio en o sobre el que se cultivan las células, o (ii) se cambian las condiciones a las que están expuestas las células para ser condiciones inductoras. En el presente contexto, una secuencia reguladora de la transcripción incluye una secuencia promotora y puede incluir además secuencias activas en cis para la expresión regulada de una secuencia asociada en respuesta a señales medioambientales.

En determinadas realizaciones de ARN replicón y auxiliar, la transcripción y traducción están controladas separadamente por diferentes elementos reguladores. El replicón contiene un promotor que dirige la transcripción; un elemento IRES; y una secuencia codificadora (por ejemplo, para una proteína o fragmento heterólogo), en la que el elemento IRES está localizado de manera operativa de manera que la traducción de la secuencia codificadora es a través de un mecanismo independiente de caperuza dirigido por el elemento IRES y no a través del mecanismo dependiente de caperuza (véase la Patente U.S. No. 7.442.381 de Smith et al.). El término "transcripción" tal y como se usa en la presente memoria incluye la producción de ARN a partir de un promotor subgenómico de alfavirus de un ácido nucleico replicón recombinante, que puede ser él mismo una molécula de ARN. Esto es, el promotor subgenómico en una molécula de ARN replicón o auxiliar recombinante puede dirigir la transcripción de un ARN mensajero que codifica un ácido nucleico heterólogo de interés o una proteína estructural de alfavirus. Separadamente, el ácido nucleico replicón o auxiliar recombinante puede "replicarse," es decir, copiarse a partir de la secuencia de reconocimiento de la replicación 5' a través de la secuencia de reconocimiento de la replicación.

En realizaciones de ARN auxiliar y para producir el ARN replicón, se utiliza un promotor para sintetizar ARN en una reacción de transcripción *in vitro*, y los promotores específicos adecuados para este uso incluyen los promotores de ARN polimerasa SP6, T7, y T3. En las realizaciones de ADN auxiliar, el promotor funciona en una célula para dirigir la transcripción de ARN. Los promotores potenciales para la transcripción *in vivo* de la construcción incluyen promotores eucariotas tales como promotores de ARN polimerasa II, promotores de ARN polimerasa III, o promotores virales tales como MMTV y MoSV LTR, región temprana de SV40, RSV o CMV. En la técnica están disponibles muchos otros promotores de mamíferos y virales adecuados. Alternativamente, pueden emplearse promotores de ARN polimerasa dependientes de ADN de bacterias o bacteriófago, por ejemplo, SP6, T7, y T3, para uso *in vivo*, proporcionándose la ARN polimerasa concordante a la célula, bien mediante un plásmido separado, vector de ARN, o vector viral. En una realización específica, la ARN polimerasa concordante puede transformarse de manera estable en una línea celular auxiliar bajo el control de un promotor inducible.

En determinadas construcciones, el control de la expresión del ácido nucleico al nivel de la traducción se consigue introduciendo un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) en 3' del promotor, por ejemplo, el promotor subgenómico 26S de alfavirus, y en 5' de la secuencia codificadora, por ejemplo, para que se traduzca la secuencia heteróloga o una proteína estructural de alfavirus. El elemento IRES se posiciona de manera que dirige la traducción del ARNm, minimizando, limitando o evitando de esta manera el inicio de la traducción del ARNm de la estructura de metil-7-guanosina (5')pppN presente en el extremo 5' del ARNm subgenómico (la "caperuza"). Estas construcciones resultan en la traducción controlada por IRES de una secuencia heteróloga independientemente de la transcripción dirigida por promotor. Pueden emplearse los IRES de muchas fuentes diferentes, incluyendo elementos IRES virales de picornavirus, por ejemplo, poliovirus (PV) o el enterovirus humano 71, por ejemplo, cepas 7423/MS/87 y BrCr de éstos, de virus de encefalomiocarditis (EMCV); de virus de enfermedad pie-y-boca (FMDV); de flavivirus, por ejemplo, virus de la hepatitis C (HCV); de pestivirus, por ejemplo, virus de la fiebre porcina clásica (CSFV); de retrovirus, por ejemplo, virus de la leucemia murina (MLV); de lentivirus, por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV); de elementos IRES de ARNm celular tales como los de los factores del inicio de la traducción, por ejemplo, eIF4G o DAP5; de factores de transcripción, por ejemplo, c-Myc o factor represor de NF-κB (NRF); de factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF B); de genes homeóticos, por ejemplo, Antennapedia; de proteínas de supervivencia, por ejemplo, inhibidor ligado a X de la apoptosis (XIAP) o Apaf-1; de chaperonas, por ejemplo, proteína de unión de la cadena pesada de inmunoglobulina BiP, virus de plantas, así como cualesquiera otros elementos IRES conocidos actualmente o posteriormente.

Cualesquiera aminoácidos que aparecen en las secuencias de aminoácidos referidas en la especificación tienen sus abreviaturas habituales de tres y una letra usadas rutinariamente en la técnica: A, Ala, Alanina; C, Cys, Cisteína; D, Asp, Ácido Aspártico; E, Glu, Ácido Glutámico; F, Phe, Fenilalanina; G, Gly, Glicina; H, His, Histidina; I, Ile, Isoleucina; K, Lys, Lisina; L, Leu, Leucina; M, Met, Metionina; N, Asn, Asparagina; P, Pro, Prolina; Q, Gln, Glutamina; R, Arg, Arginina; S, Ser, Serina; T, Thr, Treonina; V, Val, Valina; W, Try, Triptófano; Y, Tyr, Tirosina.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión dirigida por una secuencia particular es la transcripción de una secuencia asociada en 3'. Si es apropiado y se desea para la secuencia asociada, ahí la expresión del término también engloba la traducción (síntesis de proteína) del ARN transcrito o introducido. Alternativamente, pueden usarse diferentes secuencias para dirigir la transcripción y la traducción.

Las células permisivas para alfavirus empleadas en los presentes métodos son células que, después de la transfección con un transcrito de ARN viral completo, son capaces de producir partículas viales. Los alfavirus tienen un amplio rango de huéspedes. Los ejemplos de células de empaquetamiento adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, células Vero, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de fibroblasto de embrión de pollo, DF-1, 293, 293T, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), y células de insecto.

Las expresiones "proteína estructural" o "proteína estructural de alfavirus" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a una o más de las proteínas codificadas por alfavirus que se requieren para el empaquetamiento del replicón de ARN, e incluyen típicamente la proteína de la cápside, glicoproteína E1, y glicoproteína E2 en el alfavirus maduro (determinados alfavirus, tales como Virus del Bosque de Semliki, contienen una proteína adicional, E3, en la cubierta madura). El término "proteína(s) estructural(es) de alfavirus" se refiere a una o una combinación de las proteínas estructurales codificadas por los alfavirus. Éstas se sintetizan (a partir del genoma viral) como una poliproteína y se representan generalmente en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte de membrana para las dos glicoproteínas, E2 y E1. Así, el uso del término E1 en la presente memoria puede referirse a E1, E3-E1, 6k-E1, o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en la presente memoria puede referirse a E2, E3-E2, 6k-E2, o E3-6k-E2.

Las proteínas estructurales de los alfavirus están distribuidas entre una o más moléculas de ácido nucleico auxiliares (por ejemplo, un primer ARN (o ADN) auxiliar y un segundo ARN (o ADN) auxiliar). Además, una o más proteínas estructurales pueden estar localizadas en la misma molécula que el ácido nucleico replicón, siempre que al menos una proteína estructural está delecionada del ARN replicón de manera que el replicón y la partícula de alfavirus resultante son defectuosas para la replicación. Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "delecionado" o "delección" significan bien delección total del segmento especificado o la delección de una parte suficiente del segmento especificado para convertir el segmento en no operativo o no funcional, según el uso estándar. Véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 4.650.764 de Temin et al. El término "defectuoso para la replicación" tal y como se usa en la presente memoria es sinónimo de "defectuoso para la propagación", y significa que las partículas producidas en una célula huésped dada no pueden producir partículas de progenie en la célula huésped, debido a la ausencia de la función auxiliar, es decir, las proteínas estructurales de alfavirus requeridas para el empaquetamiento del ácido nucleico replicón. Sin embargo, el ácido nucleico replicón es capaz de replicarse él mismo y expresarse en la célula huésped en la que se ha introducido.

Los métodos para la producción económica y eficiente de partículas con alto rendimiento se describen en la Patente U.S. No. 7.078.218, presentada el 18 de julio, 2006, como lo son las cepas y virus atenuados útiles para la expresión de una secuencia codificadora de IL-12 expresable. Los métodos para preparar composiciones secas y reconstituidas que contienen VRP relacionados con VEE se describen en WO 2008/058035 y en la Solicitud Publicada U.S. 2009/0047255.

La célula auxiliar, también referida como una célula de empaquetamiento, usada para producir las partículas de alfavirus infecciosas, defectuosas para la replicación, debe expresar o ser capaz de expresar proteínas estructurales de alfavirus suficientes para empaquetar el ácido nucleico replicón. Las proteínas estructurales pueden producirse a partir de un conjunto de ARN, típicamente dos que se introducen en la célula auxiliar concomitantemente con o antes de la introducción del vector replicón. El primer ARN auxiliar incluye ARN que codifica al menos una proteína estructural de alfavirus pero no codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus. El primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 de alfavirus, pero que no codifica la proteína de la cápside de alfavirus y la glicoproteína E2 de alfavirus. Alternativamente, primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E2 de alfavirus, pero que no codifica la proteína de la cápside de alfavirus y la glicoproteína E1 de alfavirus. En una realización adicional, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 de alfavirus y la glicoproteína E2 de alfavirus, pero no la proteína de la cápside de alfavirus. En una cuarta realización, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la cápside de alfavirus, pero ninguna de las glicoproteínas de alfavirus. En una quinta realización, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la cápside y una de las glicoproteínas, es decir, bien E1 o E2, pero no ambas.

En combinación con uno cualquiera de estos primeros ARN auxiliares, el segundo ARN auxiliar codifica al menos una proteína estructural de alfavirus no codificada por el primer ARN auxiliar. Por ejemplo, cuando el primer ARN auxiliar sólo codifica la glicoproteína E1 de alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede codificar una o ambas de la proteína de la cápside de alfavirus y la glicoproteína E2 de alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar sólo codifica la

proteína de la cápside de alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede incluir ARN que codifica una o ambas de las glicoproteínas de alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar sólo codifica la glicoproteína E2 de alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede codificar una o ambas de la proteína de la cápside de alfavirus y la glicoproteína E1 de alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar codifica tanto la cápside como la glicoproteína E1 de alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede incluir ARN que codifica una o ambas de la proteína de la cápside de alfavirus y la glicoproteína E2 de alfavirus.

En los ácidos nucleicos auxiliares, se entiende que estas moléculas comprenden además secuencias necesarias para la expresión (englobando traducción, y cuando es apropiado, señales de transcripción o replicación) de las secuencias de proteína estructural codificadas en las células auxiliares. Dichas secuencias pueden incluir, por ejemplo, promotores, (bien virales, procariotas o eucariotas, inducibles o constitutivos), elementos IRES, y secuencias de reconocimiento de replicasa viral 5' y 3'. Los ácidos nucleicos auxiliares sin promotor también pueden ser ventajosos (véase Solicitud Publicada U.S. No. 2009-0075384). En el caso de los ácidos nucleicos auxiliares que expresan una o más glicoproteínas, se entiende de la técnica que estas secuencias se expresan ventajosamente con una secuencia líder o señal en el extremo N de la región codificadora de la proteína estructural en las construcciones de ácido nucleico. La secuencia líder o señal puede derivar del alfavirus, por ejemplo, E3 ó 6k, o puede ser una secuencia heteróloga tal como un péptido señal del activador de plasminógeno tisular o una secuencia sintética. Así, como un ejemplo, un primer ácido nucleico auxiliar puede ser una molécula de ARN que codifica la cápside-E3-E1, y el segundo ácido nucleico auxiliar puede ser una molécula de ARN que codifica la cápside-E3-E2. Alternativamente, el primer ARN auxiliar puede codificar sólo la cápside, y el segundo ARN auxiliar puede codificar E3-E2-6k-E1. Además, la señal de empaquetamiento o "secuencia de encapsidación" que está presente en el genoma viral no está presente en todos los ácidos nucleicos auxiliares. Preferiblemente, la o las señales de empaquetamiento están delecionadas de todos los ácidos nucleicos auxiliares.

Estos auxiliares de ARN pueden introducirse en las células de varias maneras. Pueden expresarse a partir de uno o más casetes de expresión que se han transformado de manera estable en las células, estableciendo de esta manera líneas celulares de empaquetamiento (véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 6.242.259). Alternativamente, los ARN pueden introducirse como moléculas de ARN o ADN que pueden expresarse en la célula auxiliar sin integrarse en el genoma celular. Los métodos para la introducción incluyen electroporación, vectores virales (por ejemplo, SV40, adenovirus, nodavirus, astrovirus), y transfección mediada por lípidos.

Una alternativa a ARN auxiliares múltiples es el uso de una única molécula de ADN, que codifica todos los polipéptidos necesarios para el empaquetamiento del ARN replicón viral en partículas de replicón de alfavirus infectivas (véase Patente U.S. No. 7.045.335). El único auxiliar ADN puede introducirse en la célula de empaquetamiento por cualesquiera medios conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitado a electroporación, transfección mediada por lípidos, (lipofección), con vectores virales (por ejemplo, adenovirus o SV-40), o transfección mediada por fosfato de calcio. Preferiblemente, el ADN se introduce mediante métodos basados en electroporación. El ADN se electropora típicamente en células con una disminución en voltaje y un incremento en capacitancia, comparado con el requerido para la captación de ARN. En todas las reacciones de electroporación, el valor para el voltaje y la capacitancia debe ajustarse de manera que se evite destruir la capacidad de las células de empaquetamiento (huésped) para producir partículas de alfavirus infectivas. Alternativamente, la función auxiliar, en este formato y bajo un promotor inducible, puede incorporarse en el genoma de la célula de empaquetamiento antes de la introducción/expresión del replicón de vector de ARN, y después inducirse con el estímulo apropiado justo antes de, concomitante con, o después de la introducción del replicón de vector de ARN.

Ventajosamente, uno o más de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas estructurales de alfavirus, es decir, la cápside, glicoproteína E1 y glicoproteína E2, o la construcción de replicón, contiene una o más mutaciones atenuantes. Las expresiones "mutación atenuante" y "aminoácido atenuante" tal y como se usan en la presente memoria, significan una mutación de nucleótido (que puede estar o no en una región del genoma viral que codifica polipéptidos) o un aminoácido codificado por una mutación de nucleótido, que en el contexto de un virus vivo, resultan en una probabilidad disminuida de que el alfavirus cause una enfermedad en su huésped (es decir, una pérdida de virulencia), según la terminología estándar en la técnica, Véase, por ejemplo, B. Davis, et al., Microbiology 156-158, (4a ed. 1990), ya sea la mutación una mutación de sustitución, o una mutación de delección o adición en marco. La expresión "mutación atenuante" excluye las mutaciones que serían letales para el virus, a no ser que dicha mutación se use en combinación con una mutación "de restauración" que convierte al virus en viable, no obstante atenuado. Los métodos para identificar mutaciones atenuantes adecuadas en el genoma de alfavirus se conocen en la técnica. Olmsted et al. (1984; Science 225:424) describe un método para identificar mutaciones atenuantes en el virus Sindbis seleccionando el crecimiento rápido en cultivo celular. Johnston y Smith (1988; Virology 162:437) describen la identificación de mutaciones atenuantes en VEE aplicando presión selectiva directa para penetración acelerada de células BHK. Las mutaciones atenuantes en alfavirus se han descrito en la técnica, por ejemplo, White et al. 2001 J. Virology 75:3706; Kinney et al. 1989 Virology 70:19; Heise et al. 2000 J. Virology 74:4207; Bernard et al 2000 Virology 276:93; Smith et al 2001 J. Virology 75:11196; Heidner y Johnston 1994 J. Virology 68:8064; Klimstra et al. 1999 J. Virology 73:10387; Glasgow et al. 1991 Virology 185:741; Polo y Johnston 1990 J. Virology 64:4438; y Smerdou y Liljestrom 1999 J. Virology 73:1092.

En determinadas realizaciones, el ARN replicón comprende al menos una mutación atenuante. En otras realizaciones específicas, el o los ácidos nucleicos auxiliares incluyen al menos una mutación atenuante. En

realizaciones que comprenden dos moléculas de ácido nucleico auxiliares, al menos una molécula incluye al menos una mutación atenuante, o ambas pueden codificar al menos una mutación atenuante. Alternativamente, el ácido nucleico auxiliar, o al menos uno del primero o segundo ácidos nucleicos auxiliares incluye al menos dos, o múltiples, mutaciones atenuantes. Las mutaciones atenuantes apropiadas dependen del alfavirus usado. Por ejemplo, cuando el alfavirus es VEE, las mutaciones atenuantes adecuadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en codones en la posición de aminoácido de E2 76 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina, o histidina como el aminoácido de E2 76; codones en la posición de aminoácido de E2 120 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina como el aminoácido de E2 120; codones en la posición de aminoácido de E2 209 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina, o histidina como el aminoácido de E2 209; codones en el aminoácido de E1 272 que especifica una mutación atenuante, preferiblemente treonina o serina como el aminoácido de E1 272; codones en el aminoácido de E1 81 que especifica una mutación atenuante, preferiblemente isoleucina o leucina como aminoácido de E1 81; y codones en el aminoácido de E1 253 que especifica una mutación atenuante, preferiblemente serina o treonina como aminoácido de E1 253. Las mutaciones atenuantes adicionales incluyen mutaciones de delecciones o sustitución en el dominio de escisión entre E3 y E2 de manera que la poliproteína E3/E2 no se escinde; esta mutación en combinación con la mutación en E1-253 puede usarse en los presentes métodos y composiciones. De manera similar, pueden usarse las mutaciones presentes en cepas de vacuna vivas existentes, por ejemplo, cepa TC83 (véase Kinney et al., 1989, Virology 170: 19-30, particularmente la mutación en el nucleótido 3).

Cuando el alfavirus es el Arbovirus Sudafricano No. 86 (S.A. AR86), las mutaciones atenuantes adecuadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en los codones en la posición de aminoácido de nsP1 538 que especifica una mutación atenuante, preferiblemente isoleucina como aminoácido de nsP1 538; codones en la posición de aminoácido de E2 304 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente treonina como aminoácido de E2 en la posición 304; codones en la posición de aminoácido de E2 314 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina como aminoácido de E2 314; codones en la posición de aminoácido de E2 376 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente alanina como aminoácido de E2 376; codones en la posición de aminoácido de E2 372 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente leucina como aminoácido de E2 372; codones en la posición de aminoácido de nsP2 96 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente glicina como aminoácido de nsP2 96; y codones en la posición de aminoácido de nsP2 372 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente valina como aminoácido de nsP2 372. Las mutaciones atenuantes adecuadas útiles en las realizaciones en las que se emplean otros alfavirus son conocidas para los expertos en la técnica.

Las mutaciones atenuantes pueden introducirse en el ARN realizando mutagénesis dirigida a sitio en el ADNc que codifica el ARN, según procedimientos conocidos. Véase, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985). Alternativamente, las mutaciones pueden introducirse en el ARN por el reemplazo de fragmentos de restricción homólogos en el ADNc que codifica el ARN, según procedimientos conocidos, o en copias de ADNc usando métodos de reacción en cadena de la polimerasa mutagénica.

El vector replicón de alfavirus se introduce en células en cultivo que permiten la replicación de alfavirus y en las que también se expresan proteínas estructurales del alfavirus, de manera que el vector se empaqueta por las proteínas estructurales en ARP que se liberan eventualmente de la célula. Los métodos para la preparación de partículas de replicón de alfavirus adyuvantes infectivas, defectuosas en la propagación en altos rendimientos se describen en la Patente U.S. 7.078.218, y los métodos de formulación se describen en WO 2008/058035 y Solicitud Publicada U.S. US 2009/0047255.

Tal y como se usa en la presente memoria, TRP2 es una proteína conocida en la técnica. El antígeno de melanoma humano puede tener secuencias de aminoácidos y codificadoras como se muestra a continuación. Las secuencias codificadoras y de aminoácidos de ratón se proporcionan en las Tablas 1A y 1B, respectivamente. Las secuencias humanas que codifican TRP2 se proporcionan en las Tablas 2A, 3, 4A (véase también SEQ ID NOs: 3, 4 y 5). Otras son conocidas en la técnica. Se entiende que las secuencias que con significativamente similares a las proporcionadas en la presente memoria pueden usarse en lugar de las proporcionadas. Ventajosamente, las secuencias sustancialmente similares son 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idénticas a los aminoácidos mostrados en SEQ ID NO: 6, como se determina usando métodos de comparación de secuencias muy conocidos en la técnica. Puede haber sustituciones de aminoácidos con propiedades similares (sustituciones conservativas de aminoácidos) Por ejemplo, glutamato/aspartato, alanina/leucina/isoleucina/metionina/valina, fenilalanina/tirosina/triptófano, histidina/arginina/asparagina/lisina; y serina/treonina aminoácidos similares representativos. Un método simple para calcular el porcentaje de identidad es alinear la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 6) con la secuencia buscada para concordancia máxima, y tratar los huecos introducidos en cualquiera de las dos secuencias para optimizar el alineamiento como emparejamientos erróneos. Después, el número de concordancias se divide por el número total de residuos de SEQ ID NO: 6 más cualquier emparejamiento erróneo (huecos) introducido en SEQ ID NO: 6. Ventajosamente, la secuencia de un TRP2 usado en un régimen particular de administración de ARP tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la de la especie en la que se administran los ARP que expresan TRP2.

Los expertos en la técnica reconocen que las secuencias codificadoras pueden variar debido a la degeneración del código genético y uso de codones. Todas las secuencias sinónimas que codifican el antígeno u otro polipéptido o

proteína de interés pueden usarse en los protocolos de inmunización descritos en la presente memoria, pero las proteínas con variación limitada de una secuencia específicamente ejemplificada también puede usarse en los presentes métodos y composiciones. Las secuencias humanas alternativas y polimorfismos pueden encontrarse en Frudakis et al. (2003) *Genetics* 165: 2071-2083; Lao et al. (2007) *Ann. Human Genet.* 71: 354-369; Khong y Rosenberg (2002) *J. Immunol.* 168: 951-956.

Además, los expertos en la técnica reconocen que pueden ocurrir variaciones alélicas en las secuencias codificadoras que no cambian significativamente la actividad de las secuencias de aminoácidos de los péptidos que codifican estas secuencias. Todas estas secuencias inmunológicamente equivalentes se incluyen en el alcance de esta solicitud. Se entiende que puede haber niveles bajos de sustituciones de nucleótidos en una población de ARP que expresan TRP2 o en las proteínas codificadas, ventajosamente menos de 15% de variación en la secuencia de aminoácidos respecto a la de una proteína descrita específicamente.

Las técnicas estándar para la clonación, aislamiento de ADN, amplificación y purificación, para reacciones enzimáticas que implican ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y semejantes, y varias técnicas de separación son las conocidas y empleadas comúnmente por los expertos en la técnica. Un número de técnicas estándar se describen en referencias tales como Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Maniatis; Ausubel et al. (2000) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, Nueva York, NY, y otras fuentes muy conocidas en la técnica. Las abreviaturas y nomenclatura, cuando se emplean, se consideran estándar en el campo y usadas comúnmente en revistas profesionales tales como las citadas en la presente memoria.

Las formulaciones farmacéuticas, tales como vacunas u otras composiciones inmunogénicas, como se proporciona en la presente memoria, comprenden una cantidad inmunogénica de las partículas de replicón de alfavirus infecciosas, defectuosas en la propagación o partículas vivas, atenuadas en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad de las partículas de alfavirus infecciosas que es suficiente para evocar una respuesta inmune en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. Una cantidad de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{11} , opcionalmente 10^7 a 10^{10} , especialmente 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 ó 10^{10} , de unidades infecciosas, o ARP por dosis se cree adecuada, dependiendo de la edad y especie del sujeto que se está tratando. Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen, pero no están limitados a, agua estéril sin pirógenos y disolución salina fisiológica estéril sin pirógenos. Los sujetos a los que puede administrarse cantidades inmunogénicas de las partículas de alfavirus infecciosas, defectuosas en la replicación incluyen sujetos humanos y animales (por ejemplo, perro, cerdo, gato, ganado, caballo, burro, ratón, hámster, monos, cobaya). La administración puede ser por cualquier medio adecuado, tal como administración intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal, intravaginal, intrarectal, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones inmunogénicas que comprenden los ARP (que dirigen la expresión de la o las secuencias de interés cuando las composiciones se administran a un ser humano o animal) pueden formularse por cualquier medio conocido en la técnica. Dichas composiciones, especialmente vacunas, se preparan típicamente como inyectables, bien como disoluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. Las preparaciones liofilizadas también son adecuadas, especialmente como se describe en WO 2008/058035 y Solicitud Publicada U.S. US 2009/0047255.

Los ingredientes inmunogénicos activos (los ARP) se mezclan frecuentemente con excipientes o vehículos que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados incluyen pero no están limitados a agua estéril, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o semejantes y combinaciones de éstos, así como estabilizantes, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA) u otras proteínas adecuadas y azúcares reductores.

Además, si se desea, las vacunas pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento de pH, y/o adyuvantes que aumentan la eficacia de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes que pueden ser efectivos incluyen pero no están limitados a: hidróxido de aluminio; N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como nor-MDP); N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3hidroxifosforilo)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE); y RIBI (que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión escualeno 2%/Tween 80), MF-59 (una emulsión sub-micrométrica aceite-en-agua de un escualeno, polioxietileno sorbitán monooleato (TweenTM 80) y sorbitán trioleato), e IC31 (de Intercell, una formulación sintética que combina las propiedades inmunoestimuladoras de un péptido antimicrobiano, KLK, y un oligodesoxinucleótido inmunoestimulador, ODN1a). También puede incluirse una proteína inmuno estimuladora tal como interleuquina-12, bien como una secuencia codificadora co-expresada con el TRP2 en el mismo o proporcionada en un VRP que expresa IL-12 separado. La eficacia de un adyuvante puede determinarse midiendo la cantidad de anticuerpos y/o respuesta de célula T dirigida frente al producto inmunogénico del ARP que resulta de la administración del inmunógeno en vacunas que también están comprendidas por los distintos adyuvantes. También pueden usarse dichas formulaciones adicionales y modos de administración como son conocidos en la técnica.

Las composiciones que contienen ARP inmunogénicas (o de otra manera biológicamente activas) se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad que es profilácticamente y/o terapéuticamente activa. La cantidad que se va a administrar, que está generalmente en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{11} , o de 10^7 a 10^{10} , especialmente 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 ó 10^{10} , de unidades infecciosas por mL en una dosis, depende del sujeto que se va a tratar, la ruta por la que los ARP se administran, la inmunogenicidad del producto de expresión, los tipos de respuestas inmunes efectoras deseadas, y el grado de protección deseada. Las cantidades precisas del ingrediente activo requeridas para ser administradas pueden depender del criterio del médico, veterinario u otro profesional sanitario y pueden ser peculiares para cada individuo, pero dicha determinación está en la experiencia de dicho médico.

La vacuna u otra composición inmunogénica puede proporcionarse en esquemas de una única dosis o múltiples dosis. Un esquema de múltiples dosis es uno en el que un curso de vacunación primario puede incluir 1 a 10 o más dosis separadas, seguido de otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores según se requiera para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, semanalmente, bisemanalmente, o a 1 a 4 meses durante una segunda dosis, y si se necesita, una o unas dosis posteriores después de varios meses/años. Para la vacunación terapéutica, puede ser beneficioso un régimen de dosificación múltiple de inyecciones o administraciones mensuales durante múltiples años.

Las referencias citadas en la presente descripción reflejan el nivel de experiencia en las técnicas relevantes. Se pretende que esta información pueda emplearse en la presente memoria, si se necesita, para excluir (por ejemplo, para recusar) realizaciones específicas que están en la técnica anterior. Por ejemplo, cuando se reivindica un compuesto, debe entenderse que los compuestos conocidos en la técnica anterior, incluyendo determinados compuestos descritos en las referencias descritas en la presente memoria (particularmente en documentos de patente referenciados), no se pretende que se incluyan en la reivindicación.

Cada formulación o combinación de componentes descrita o ejemplificada puede usarse para llevar a la práctica la invención, a no ser que se indique otra cosa. Las formulaciones de VRP de la presente invención pueden prepararse según técnicas conocidas en la técnica adecuadas para las partículas relevantes, especialmente como se describe en la Publicación US 2009/0047255. Los nombres específicos de compuestos, virus, genes y proteínas se pretende que sean ejemplares, ya que se sabe que un experto en la técnica puede nombrar los mismos compuestos de manera diferente. Cuando una proteína (o el gen que la codifica) se describe en la presente memoria de manera que no se especifica una variante, isoforma, variante de corte y empalme alternativa o alelo del compuesto, por ejemplo, en una fórmula o en un nombre químico, se pretende que esta descripción incluya cada alelo, isoforma y/o variante de la proteína o gen individualmente o en cualquier combinación. Un experto en la técnica apreciará que los métodos, materiales de partida, métodos sintéticos, formulaciones vectores y técnicas adicionales distintas de las ejemplificadas específicamente pueden emplearse en la práctica de la invención sin recurrir a experimentación innecesaria. Todos los equivalentes funcionales conocidos en la técnica, de cualquiera de dichos métodos, proteínas, secuencias codificadoras, vectores, materiales de partida, formulaciones, y semejantes se pretende que estén incluidos en esta invención. Siempre que se proporcione un intervalo en la especificación, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo, o un intervalo de composición, todos los intervalos y subintervalos intermedios, así como todos los valores individuales incluidos en los intervalos proporcionados se pretende que estén incluidos en la descripción.

Tal y como se usa en la presente memoria, "que comprende" es sinónimo de "que incluye", "que contiene", o "caracterizado por", e incluye o está abierto y no excluye elementos o etapas de métodos adicionales, no recitados a no ser que se describa otra cosa. Tal y como se usa en la presente memoria, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa, o ingrediente no especificado en el elemento reivindicado. Tal y como se usa en la presente memoria, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente las características básicas y nuevas de la reivindicación. Cualquier recitación en la presente memoria del término "que comprende", particularmente en una descripción de componentes de una composición o en una descripción de elementos de un dispositivo, se entiende que engloba aquellas composiciones y métodos que consisten esencialmente en y consisten en los componentes o elementos recitados. La invención ilustrativamente descrita en la presente memoria puede llevarse a la práctica en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describan específicamente en la presente memoria.

Los términos y expresiones en la presente memoria se pretende que sean descriptivos y no limitativos, y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir cualesquiera equivalentes de las características mostradas y descritas o partes de éstas, pero se reconoce que varias modificaciones son posibles en el alcance de la invención como se reivindica. Así, debe entenderse que aunque la presente invención se ha descrito específicamente por realizaciones preferidas y características opcionales, la modificación y variación de los conceptos descritos en la presente memoria puede ser recurrida por los expertos en la técnica, y que se considera que dichas modificaciones y variaciones están en el alcance de esta invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

La formulación exacta, ruta de administración y dosificación pueden elegirse por el médico individual a la vista de la afección del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al. en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Cap. 1).

Debe indicarse que el médico responsable debería conocer cómo y cuando terminar, interrumpir, o ajustar la administración debido a toxicidad, o a disfunciones orgánicas, o a debilitamiento del sujeto. A la inversa, el médico responsable también debería saber ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera adecuada (toxicidad descartada). La magnitud de una dosis administrada en la gestión de un cáncer que expresa TRP2, tal como melanoma, variará con la gravedad de la afección que se va a tratar y la ruta de administración. La gravedad de la afección puede evaluarse, por ejemplo, en parte, por métodos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y opcionalmente, la frecuencia de la dosis también variarán según la edad, peso corporal, y respuesta del paciente individual. Un programa comparable al discutido anteriormente también puede usarse en medicina veterinaria.

Cuando el sujeto padece melanoma, el médico (o veterinario en el caso de un sujeto animal) puede elegir una estrategia de tratamiento completa que combina la administración de las composiciones VRP que expresan TRP2 inmunogénicas con tratamientos adicionales (que pueden administrarse antes de, al mismo tiempo que, o después de la administración de VRP), tal como agentes quimioterapéuticos radiactivos o químicos, anticuerpos monoclonales específicos de uno o más antígenos específicos de cáncer, por ejemplo, CTLA4 o PD1, o antígenos de melanoma tal como TRP2, interleuquinas o conjugados de los anteriores, o con intervención quirúrgica. Pueden usarse fármacos inmunosupresores, por ejemplo, paclitaxel o carboplatino como un tratamiento inicial para el cáncer, y después de que su efecto se haya declinado, pueden proporcionarse las composiciones VRP que expresan TRP2.

Dependiendo de la afección específica del sujeto que se está tratando o vacunando profilácticamente, las composiciones descritas en la presente memoria pueden formularse y administrarse sistémicamente o localmente. Las técnicas para la formulación y administración pueden encontrarse en varias referencias de la técnica muy conocidas y fácilmente accesibles en la técnica. Las rutas de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, oral, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosal, intestinal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intramedular, intratecal, intravenosa, o inyecciones intraperitoneales. Por ejemplo, para aplicaciones profilácticas, las composiciones inmunogénicas que comprenden como el agente inmunogénico activo los VRP que expresan TRP2 se administran generalmente a través de una ruta subcutánea o intramuscular. En el caso del sujeto con melanoma metastásico, puede elegirse una ruta intravenosa, o puede seleccionarse la ruta subcutánea o intramuscular. También puede haber administración simultánea a través de múltiples rutas.

Para la inyección, las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosal, los penetrantes como se conoce generalmente en la técnica y apropiados para la barrera que se va a permear se usan en la formulación.

El uso de vehículos farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos descritos en la presente memoria para la práctica de la invención en dosificaciones adecuadas para administración sistémica está en el alcance de la invención. Con la elección apropiada de vehículo y práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente invención, en particular las formuladas como disoluciones, pueden administrarse parenteralmente, tal como por inyección intravenosa. Los compuestos apropiados pueden formularse fácilmente usando vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para administración oral.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para conseguir el propósito pretendido. La determinación de las cantidades efectivas está en la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse de una manera que es conocida por sí misma, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezclado, disolución granulación, levigado, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las preparaciones farmacéuticas para uso en los presentes métodos pueden obtenerse combinando los VRP que expresan TRP2 inmunológicamente activos con excipiente sólido, pero también pueden prepararse preparaciones líquidas como se describe en la Publicación de Patente U.S. 2009/0047255 y liofilizarse para reconstitución antes de la administración al sujeto. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, hidroxietil almidón, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinil pirrolidona entrecruzada, agar, o ácido alginico o una sal de éste tal como alginato de sodio, plastificantes, tensioactivos y otros agentes adecuados para administración en composiciones inmunogénicas a seres humanos y/o animales. Los adyuvantes inmunológicos y/o citoquinas que aumentan una respuesta inmune también pueden incluirse en estas composiciones.

En general, los términos y expresiones usados en la presente memoria tienen su significado reconocido en la técnica, que puede encontrarse por referencia a textos estándar, referencias de revistas y contextos conocidos por

los expertos en la técnica. Las definiciones siguientes se proporcionan para aclarar su uso específico en el contexto de la invención.

Aunque la descripción en la presente memoria contiene determinada información específica y ejemplos, éstos no deben considerarse como que limitan el alcance de la invención como se reivindica sino como ilustraciones proporcionadas meramente de algunas de las posibles realizaciones de la invención. Por ejemplo, así el alcance de la invención debe determinarse por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes, en lugar de por los ejemplos proporcionados, pero la invención puede entenderse adicionalmente por los ejemplos no limitativos proporcionados en la presente memoria anteriormente.

Clonación de TRP2 murino

- 10 El gen de TRP-2 murino de longitud completa se amplificó por PCR a partir de un plásmido de ADN obtenido del NIH. Los cebadores para la amplificación por PCR de este plásmido se proporcionan a continuación:

cebador directo EcoR5 de TRP-2 murino (SEQ ID NO: 7)

5'-GGGACTTGTAGGATGGGGACTTTTGTTGGGATGTTTGGG-3'

cebador inverso Xba de TRP-2 murino (SEQ ID NO: 8)

- 15 5'-GGATGGCTCTAGATTAATTAATTATCATGCTTCCTCGGTATATC-3'

La secuencia codificadora resultante para la proteína TRP2 se proporciona en la Tabla 1 B y la proteína codificada en la Tabla 1 A.

Producción de replicón

- 20 Este producto TRP2 se digirió con PacI y se ligó en el vector replicón pERK3 para generar pERK3-TRP-2 murino. El vector replicón pERK3 VEE deriva del plásmido pERK descrito en la Patente U.S. No. 6.783.939, Ejemplo 2. pERK3 tiene dos sitios adicionales de escisión de endonucleasa de restricción, Scal y SnaBI en la secuencia de clonación múltiple (MCS), el extremo 5' de VEE, las proteínas no estructurales de VEE 1-4, el promotor de VEE 26S, un sitio de clonación múltiple, y la UTR (región no traducida) 3' de VEE.

Producción de VRP

- 25 El replicón que expresa TRP2 mostrado en la Figura 1A ó 1B se empaqueta usando un sistema auxiliar de ARN bipartito, que se ha descrito en las Patentes US Nos. 5.792.462, US 6.783.939 (Olmsted, et al.), US 7.045.335 (Smith et al.), y US 7.078.218).

- 30 Las células Vero se expandieron en EMEM + 5% FBS a p146, se tripsinizaron, se lavaron y se resuspendieron en 5% sacarosa/60 mM NaCl/10 mM tampón NaPi pH 7,3 hasta una concentración de $1,2 \times 10^8$ células/mL. Se mezclaron 0,5 mL de células con replicón TRP-2 murino, auxiliar de cápside (dHcap4, como se describe en la Patente U.S. No. 7.045.335) y glicoproteína (3.4.16; también referida como GP 3014), ARN auxiliares a una proporción ARN de replicón 30 µg:auxiliar de cápside 30 µg:auxiliar GP 60 µg. El auxiliar de glicoproteína se describe completamente, incluyendo su secuencia de ácido nucleico, en la Patente U.S. Número 6.783.939. El auxiliar de cápside se describe completamente en la Patente U.S. No. 7.045.335 (Smith et al.). La mezcla se transfirió a cubetas de 0,4 cm de hueco y se electroporaron a 580 voltios, 25 µFD durante un total de 4 pulsos. Las mezclas se electroporación se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min y se sembraron en botellas de en rodillos que contenían 100 mL de medio de crecimiento OptiPro con 4 mM glutamina. Los VRP TRP-2 murino se recogieron de células por un proceso de elución con mucha sal (lavado de sal, véase la Patente U.S. No. 7.078.218) con un rendimiento de 250 UI/célula. Los VRP se purificaron por cromatografía de sulfato Cellufine, se formularon en 1% albúmina de suero de ratón (MSA), 4% sacarosa, 30 mM gluconato de sodio, 500 mM cloruro de sodio, 10 mM fosfato de sodio pH 7,3 y se almacenaron a -80°C. Los VRP se titularon con anticuerpo nsP2 VEE.

Partículas de replicón viral TRP-2 humano

- 45 En primer lugar, el gen de TRP2 humano de longitud completa se amplificó a partir de un plásmido de ADN. Los productos de amplificación se digirieron con PacI y se ligaron en el vector replicón pERK3 cortado de manera similar con PacI para generar pERK3-TRP-2 humano.

Cebadores para la amplificación por PCR

cebador directo EcoR5 de TRP-2 humano

5'-GAGCCCCCTTTGGTGGGGGTTTCTGCTCAGTTGCTTGG -3'

cebador inverso Xba/PacI de TRP-2 humano

5'-GGATGGCTCTAGATTAATTAATTACTAGGCTTCTTCTGTGTATC-3'

Empezando en el promotor T7 y moviéndose en el sentido de las agujas del reloj en la Fig. 1B, las flechas sólidas representan los cuatro genes de proteína no estructural viral de VEE (nsP1-nsP4), el gen de TRP-2 humano y el gen de resistencia a kanamicina [KN(R)], respectivamente.

Los VRP que expresan TRP2 humano se preparan como se ha descrito anteriormente pero se formulan con albúmina de suero humana en lugar de MSA. En general, los VRP se formulan con albúmina de suero derivada de la misma especie que la de la preparación que se va a administrar.

Inmunización con VRP y pulso con tumor

Ratones y líneas celulares.

Los ratones C57BL/6J (hembras de 8-10 semanas de edad) y deficientes C3 (cepa B6.129S4-C3tm 1 crr/J) se obtuvieron del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones deficientes en MHC clase I (cepa B2MN12), deficientes en MHC clase II (cepa ABBN12) y controles de tipo salvaje (WT) (cepa B6NTac) se adquirieron en Taconic Farms, Inc. (Hudson, NY). Los ratones deficientes en la cadena γ común de FcR, proporcionados por J. Ravetch (Rockefeller University, Nueva York, NY) se retrocruzaron en tipo salvaje C57BL/6 y se criaron en MSKCC.

La línea de melanoma de ratón B16-F10 se obtuvo originariamente de I. Fidler (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX), B78H1 (una línea celular de melanoma de ratón negativa Tyrp-1 y TRP-2 derivada de B16) y el carcinoma de pulmón de Lewis se cultivaron en RPMI completo. A no ser que se indique otra cosa, los ratones se vacunaron tres veces con 10^6 VRP diluido en PBS por inyección subcutánea en la superficie plantar de cada almohadilla de la pata para cada vacunación.

En los experimentos de protección tumoral (profiláctica), los ratones C57BL/6 se vacunaron tres veces, en intervalos de catorce días, con 10^6 VRP diluido en PBS por inyección subcutánea en la superficie plantar de cada almohadilla de la pata. En un subconjunto de estos ratones, los ratones individuales se pulsaron con $7,5 \times 10^4$ células de melanoma B16F10 inyectadas intradérmicamente (i.d.) dos semanas después de la tercera vacunación bi-mensual con VRP.

En los experimentos de protección tumoral terapéutica, se inyectó a ratones C57BL/6 en primer lugar $7,5 \times 10^4$ células B16F10 bien intradérmicamente (modelo terapéutico cutáneo) o intravenosamente (modelo terapéutico de pulmón), y se vacunaron semanalmente tres veces, empezando un día después del pulso. Después de la vacunación, se midieron los diámetros tumorales con calibradores; en algunos experimentos, los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 1 cm de diámetro, se ulceraron o causaron malestar a los animales. Para otros estudios, los animales se monitorizaron cada 2 a 3 días durante 80 días. Para la evaluación del desarrollo del tumor pulmonar, los pulmones se recogieron 24 días después del pulso de células tumorales intravenoso, se lavaron tres veces con PBS y se pesaron. La supervivencia sin tumor se reporta en las figuras de la presente memoria. Cada grupo de ratones tenía 10 ratones, $p < 0,01$. Para las curvas de supervivencia sin tumor de Kaplan-Meier, se consideró que los ratones no tenían tumor hasta que los tumores fueron visibles o palpables. Los valores p se calcularon con el ensayo de rango logarítmico (Mantel-Cox).

En los experimentos de depleción de células T (Figura 6B), las células CD4+, células CD8+ y células NK/NKT se deplecionaron mediante inyección de 200 μ g de anticuerpos GK1.5, 2.43 y PK136, respectivamente, intraperitonealmente en el día -11, -4, +4, +11, respecto a la inoculación del tumor.

Ensayos ELISPOT y de células T

Los péptidos analizados, incluyendo TRP2₁₈₁₋₁₈₉ se sintetizaron por Genemed Synthesis (San Antonio, TX) y tuvieron más de 80% de pureza, como se determina por cromatografía líquida de alto rendimiento.

Los bazo recogidos 5 a 7 días después de la tercera inmunización con VRP se disrumpieron mecánicamente, y se lisaron los RBC. Las células T CD8+ se seleccionaron positivamente de esta mezcla por incubación con lechos magnéticos anti-CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Se determinó la producción de interferón γ (IFN- γ) usando el ensayo ELISPOT estándar después de 20 a 36 h de incubación de células T CD8+ (10^5 por pocillo) con esplenocitos pulsados con 1 μ g/mL del péptido específico de TRP2 indicado. Las placas se analizaron usando un sistema lector de ELISPOT automatizado con software KS 4.3 (Carl Zeiss, Thornwood, NY). Se realizaron ensayos de tinción intracelular basados en citometría de flujo con el kit de fijación y permeabilización (eBioscience, San Diego, CA) usando anti-CD8-PE-rojo Texas, anti-CD3-FITC, anti-IFN γ -APC (BD Biosciences, San Jose, CA) y el kit LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (ViD) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

ELISA

Para detectar IgG totales específicas de TRP2 circulantes en suero, se inmunizaron grupos de ratones con VRP que expresan TRP2 tres veces, con una separación de dos semanas entre cada inmunización. Siete días a dos semanas después de la última vacunación, los ratones se sangraron en la vena de la cola. Las muestras de sangre se incubaron a 37°C durante una hora y se centrifugaron durante 5 min a 7.000 g. El suero combinado se recogió en un tubo separado y se almacenó a -20°C.

Las placas de ELISA (Costar) se recubrieron O/N con 1 µg/mL de TRP2 recombinante purificado en PBS, se bloquearon con 5% leche seca reconstituida desnatada en PBS durante 2 horas, y se incubaron a 4°C con diluciones seriadas de suero (4 veces: 1:100, 1:400, 1:1.600, etc.) en disolución de bloqueo. Después de 18 horas, las placas se lavaron 6 veces con PBS+0,1% Tween 20 y se incubaron con el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón de cabra-AP, Southern Biotech, Birmingham, AL) en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se incubaron en la oscuridad durante 30 min con el sustrato (Promega, Madison, WI, S1013), y el desarrollo del color se paró añadiendo 3N NaOH. Las placas se analizaron usando un lector ELISA a una Excitación 450/50 y Emisión 580/50 con ganancia de 25 (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, Serie Cytoflour 4000).

Análisis del infiltrado tumoral

Siete días después de la inyección subcutánea de B16-Matrigel (1 x 10⁵ células B16-F10 en 0,2 ml de Matriz Matrigel con Factor de Crecimiento Reducido; BD Biosciences), el tapón de matrigel se reseccionó, se incubó durante 1 hora a 37°C con 1 mg/ml de Colagenasa D (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se disoció para obtener una suspensión de células únicas. Las células se tiñeron con anti-CD45.2 PercpCy5.5, anti-CD3-FITC, anti-NK1.1-APC, anti-CD8-PE-rojo Texas, anti-CD4-Alexa Fluor 700 (Becton Dickinson) y DAPI.

Transferencia de suero

Se recogieron muestras de suero de ratones siete días después de la tercera inmunización bi-semanal con VRP. Se inyectaron cincuenta µl de suero i.v. en ratones receptores en el día 0, 3 y 6. Los ratones receptores se pulsaron con 7,5 x 10⁴ células tumorales B16-F10 intradérmicamente en el día 0, y la aparición de tumores se monitorizó como se ha descrito anteriormente.

Tabla 1A. Secuencia de Aminoácidos de la Proteína TRP2 Murina (SEQ ID NO: 1)

Met Gly Leu Val Gly Trp Gly Leu Leu Leu Gly Cys Leu Gly Cys Gly
 Ile Leu Leu Arg Ala Arg Ala Gln Phe Pro Arg Val Cys Met Thr Leu
 Asp Gly Val Leu Asn Lys Glu Cys Cys Pro Pro Leu Gly Pro Glu Ala
 Thr Asn Ile Cys Gly Phe Leu Glu Gly Arg Gly Gln Cys Ala Glu Val
 Gln Thr Asp Thr Arg Pro Trp Ser Gly Pro Tyr Ile Leu Arg Asn Gln
 Asp Asp Arg Glu Gln Trp Pro Arg Lys Phe Phe Asn Arg Thr Cys Lys
 Cys Thr Gly Asn Phe Ala Gly Tyr Asn Cys Gly Gly Cys Lys Phe Gly
 Trp Thr Gly Pro Asp Cys Asn Arg Lys Lys Pro Ala Ile Leu Arg Arg
 Asn Ile His Ser Leu Thr Ala Gln Glu Arg Glu Gln Phe Leu Gly Ala
 Leu Asp Leu Ala Lys Lys Ser Ile His Pro Asp Tyr Val Ile Thr Thr
 Gln His Trp Leu Gly Leu Leu Gly Pro Asn Gly Thr Gln Pro Gln Ile
 Ala Asn Cys Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu His Tyr Tyr Ser
 Val Arg Asp Thr Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Lys Ala Ile Asp
 Phe Ser His Gln Gly Pro Ala Phe Val Thr Trp His Arg Tyr His Leu
 Leu Trp Leu Glu Arg Glu Leu Gln Arg Leu Thr Gly Asn Glu Ser Phe
 Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Phe Ala Thr Gly Lys Asn Glu Cys Asp Val
 Cys Thr Asp Asp Trp Leu Gly Ala Ala Arg Gln Asp Asp Pro Thr Leu
 Ile Ser Arg Asn Ser Arg Phe Ser Thr Trp Glu Ile Val Cys Asp Ser
 Leu Asp Asp Tyr Asn Arg Arg Val Thr Leu Cys Asn Gly Thr Tyr Glu
 Gly Leu Leu Arg Arg Asn Lys Val Gly Arg Asn Asn Glu Lys Leu Pro
 Thr Leu Lys Asn Val Gln Asp Cys Leu Ser Leu Gln Lys Phe Asp Ser
 Pro Pro Phe Phe Gln Asn Ser Thr Phe Ser Phe Arg Asn Ala Leu Glu
 Gly Phe Asp Lys Ala Asp Gly Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Asn Leu
 His Asn Leu Ala His Ser Phe Leu Asn Gly Thr Asn Ala Leu Pro His
 Ser Ala Ala Asn Asp Pro Val Phe Val Val Leu His Ser Phe Thr Asp
 Ala Ile Phe Asp Glu Trp Leu Lys Arg Asn Asn Pro Ser Thr Asp Ala
 Trp Pro Gln Glu Leu Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Met Tyr Asn Met
 Val Pro Phe Phe Pro Pro Val Thr Asn Glu Glu Leu Phe Leu Thr Ala
 Glu Gln Leu Gly Tyr Asn Tyr Ala Val Asp Leu Ser Glu Glu Glu Ala

Pro Val Trp Ser Thr Thr Leu Ser Val Val Ile Gly Ile Leu Gly Ala
Phe Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala Phe Leu Gln Tyr Arg Arg Leu
Arg Lys Gly Tyr Ala Pro Leu Met Glu Thr Gly Leu Ser Ser Lys Arg
Tyr Thr Glu Glu Ala

Tabla 1B. Secuencia Codificadora para TRP-2 Murina (SEQ ID NO: 2)

ATGGGACTTGTAGGATGGGGACTTTTGTGGGATGTTGGGATGTGGAATCCTGCTGCGCGCCCGAGCTC
AATTCCCCAGAGTGTGTATGACCCCTTGACGGGGTGCTGAACAAAGAATGCTGTCTCCCTCGGCCCCAGA
GGCAACTAATATTTGCGGCTTCTTGGGAAGGCAGGGGACAGTGTGCCGAGGTCCAGACCGATACAAGGCC
TGGTCCGGGCCATACATTCTTCGGAATCAAGATGACAGGGAACAGTGGCCTCGGAAGTTCTTCAACCGGA
CTTGCAATGCACAGGAAATTTGCAAGGTATAATTGCGGCGGATGTAAGTTCGGGTGGACTGGCCCGAGA
TTGTAATAGAAAGAGCCTGCTATCCTGAGGCGGAACATTACAGTTTGACAGCTCAGGAGAGAGAGCAG
TTTCTGGGTGCCCTCGATTGGCCAAAGAAGATATTATCCTGATTATGTGATAACTACTCAACATTGGC
TGGGACTGCTCGGTCCAAACGGGACACAACCTCAGATCGCAACTGTTCTGTGTACGACTTCTTCGTGTG
GCTTCACTATTACAGCGTCCGGGACACTCTCCTCGGACCTGGGCGCCCTTATAAAGCAATCGACTTCTCC
CATCAGGGTCCAGATTGTGCACTTGGCACCCTACCATCTGCTCTGGCTTGAGCGCGAGTTGCAGCGAC
TGACCGGGAATGAGTCATTGCACTGCCTTACTGGAATTTGCAACAGGCAAGAATGAGTGTGATGTTTG
CACTGATGATTGGCTCGGAGCGCAAGGCAGGATGACCTACTCTCATCAGCCGAATAGCCGGTTTTC
ACCTGGGAGATTGTGTGTGATAGTTTGGATGACTACAACAGGCGCGTGACACTGTGTAATGGGACATACG
AGGACTCCTGCGCCGGAATAAGGTGGGACGCAACAATGAAAAGCTGCCACGCTGAAGAATGTGCAGGA
TTGCTGAGCCTTCAGAAATTCGATTCCCCACCATTCTTTTCAAGTCCACCTTCTCTTTTCGAAATGCA
CTTGAGGGGTTTGACAAGGCGGATGGGACTTTGGATTCTCAGGTATGAAATTTGCACAATCTGGCGCACA
GCTTCTGAACGGAACCAATGCATTGCCGACTCCGCTGCAACAGATCCCGTGTGTGGTCTCCATTTC
CTTACGGGACGCTATATTTGATGAATGGTTGAAAAGAAATAATCCTTCAACCGACGCGTGCCCGCAAGAG
CTTGCTCCGATTGGCCATAACAGGATGTATAATATGGTGCCCTTCTTCTCCCGTGACTAATGAAGAGC
TTTTCTTGACCGCAGAGCAGCTCGGCTATAATTATGCGGTAGACCTTAGTGAGGAAGAGGCTCCCGTGTG
GAGCACCCTCTCTCAGTGGTGATAGGGATCTTGGGCGCGTTTGTACTGCTGCTGGGCTGCTTGCCCTTC
TTGCAGTACAGGAGCTGAGGAAGGATATGCTCCTTTGATGGAAACCGTTTGTCTAGCAAAGATATA
CCGAGGAAGCATGA

Tabla 2A. TRP-2 Humana (Secuencia de Referencia NCBI: NT_009952.14) (SEQ ID NO: 3)

AACTGAGTTCAAGGCAATTAAAGTCAAGAGCTAAGGAGGGAGGGAGAGGGTTTAGAAAT
ACCAGCATAATAAGTAGTATGACTGGGTGCTCTGTAAATTAAGTCAATTAGACAAAGCC
TGACTTAACGGGGGAAGATGGTGAGAAGCGCTACCCCTATTAAATTTGGTTGTTAGAGG
CGCTTCTAAGGAAATTAAGTCTGTAGTTGTTTGAATCACATAAAATTTGTGTGTGCACG
TTCATGTACACATGTGCACACATGTAACCTCTGTGATTCTTGTGGGTATTTTTTTAAGA
AGAAAGGAATAGAAAGCAAGAAAAATAAAAAATACTGAAAAGAAAAGACTGAAAGAGT
AGAAGATAAGGAGAAAAGTACGACAGAGACAAGGAAAAGTAAGAGAGAGAGAGAGCTCTC
CCAATTATAAAGCCATGAGCCCCCTTTGGTGGGGGTTTCTGCTCAGTTGCTTGGGCTGC
AAAATCCTGCCAGGAGCCAGGGTCAGTTCCCCCGAGTCTGCATGACGGTGGACAGCCT
AGTGAACAAGGAGTGTGCCCACGCTTGGGTGCAGAGTCGGCCAATGTCTGTGGCTCTC
AGCAAGGCCGGGGCAGTGCAAGAGGTGCGAGCCGACACAAGGCCCTGGAGTGGTCCC
TACATCCTACGAAACCAGGATGACCGTGAGCTGTGGCCAAGAAAATTTTCCACCGGAC
CTGCAAGTGCACAGGAAACTTTGCCGGCTATAATTGTGGAGACTGCAAGTTTGGCTGGA
CCGGTCCCAACTGCGAGCGGAAGAAACCACAGTGATTGCGCAGAACATCCATTCTTG
AGTCTCAGGAAAGAGAGCAGTTCTTGGGCGCCTTAGATCTCGCGAAGAAGAGAGTACA

CCCCGACTACGTGATCACCACACAACACTGGCTGGGCCTGCTTGGGCCCCAATGGAACCC
 AGCCGCAGTTTGCCAACTGCAGTGTATGATTTTTTTGTGTGGCTCCATTATTATTCT
 GTTAGAGATACATTATTAGGACCAGGACGCCCTACAGGGCCATAGATTTCTCACATCA
 AGGACCTGCATTTGTTACCTGGCACCAGTACCATTGTTGTGTCTGGAAAGAGATCTCC
 AGCGACTCATTGGCAATGAGTCTTTTGCTTTGCCCTACTGGAACCTTGCCACTGGGAGG
 AACGAGTGTGATGTGTGTACAGACCAGCTGTTTGGGGCAGCGAGACCAGACGATCCGAC
 TCTGATTAGTCGGAACCTCAAGATTCTCCAGCTGGGAACTGTCTGTGATAGCTTGGATG
 ACTACAACCACCTGGTCACCTTGTGCAATGGAACCTATGAAGGTTTGTCTGAGAAGAAAT
 CAAATGGGAAGAAACAGCATGAAATTGCCAACCTTAAAAGACATACGAGATTGCCTGTC
 TCTCCAGAAGTTTGACAATCCTCCCTTCTTCCAGAACTCTACCTTCAGTTTCAGGAATG
 CTTTGGGAAGGGTTTGATAAAGCAGATGGGACTCTGGATTCTCAAGTGATGAGCCTTCAT
 AATTTGGTTCATTCCCTTCTTGAACGGGACAAACGCTTTGCCACATTCAGCCGCCAATGA
 TCCCATTTTTGTGGTGATTTCTAATCGTTTGTCTTACAATGCTACAACAAACATCCTTG
 AACATGTAAGAAAAGAGAAAGCGACCAAGGAACTCCCTTCCCTGCATGTGCTGGTTCTT
 CATTCCTTTACTGATGCCATCTTTGATGAGTGGATGAAAAGATTTAATCCTCCTGCAGA
 TGCCCTGGCCTCAGGAGCTGGCCCCCTATTGGTCACAATCGGATGTACAACATGGTTCCTT
 TCTTCCCTCCAGTGACTAATGAAGAAGCTTTTTTAACCTCAGACCAACTTGGCTACAGC
 TATGCCATCGATCTGCCAGTTTCAGTTGAAGAACTCCAGGTTGGCCCACTCTCTT
 AGTAGTCATGGGAACACTGGTGGCTTTGGTGGTCTTTTTGTGCTGTTGGCTTTTCTTC
 AATATAGAAGACTTCGAAAAGGATATACACCCCTAATGGAGACACATTTAAGCAGCAAG
 AGATACACAGAAGAAGCCTAGGGTGCTCATGCCCTACCTAAGAGAAGAGGCTGGCCAAG
 CCACAGTTCTGACGCTGACAATAAAGGAACTAATCCTCACTGTTTCTTCTTGTGAGTTGAA
 GATCTTTGACATAGGTTCTTCTATAGTGATGATGATCTCATTGAGAAGATGCTTAGCTG
 TAGTTTCCGCTTTGCTTGCTTGTGTTAACAACCCAACTAAAGTGCTTGAGGCTACCTCT
 ACCTTCAAATAAAGATAGACCTGACAATTTGTGATATCTAATAATAACCCCCCCCCCAA
 TATTGATTAAAGCCTCCTCCTTTTCTGAAAGCATTAAAAAAA

Tabla 3. Variante2 deTranscripción de TRP-2 Humana (Secuencia de Referencia NCBI: NM_001129889.1) SEQ ID NO: 4)

AACTGAGTTCAAGGCAATTAAAGTCAAGAGCTAAGGAGGGAGGGAGAGGGTTTAGAA
 ATACCAGCATAATAAGTAGTATGACTGGGTGCTCTGTAAATTAACCTCAATTAGACAA
 AGCCTGACTTAACGGGGGAAGATGGTGAGAAGCGCTACCCCTCATTAATTTGGTTGT
 TAGAGGCGCTTCTAAGGAAATTAAGTCTGTTAGTTGTTTGAATCACATAAAATTGTG
 TGTGCACGTTTATGTACACATGTGCACACATGTAACCTCTGTGATTCTTGTGGGTAT
 TTTTTTAAGAAGAAAGGAATAGAAAGCAAAGAAAAATAAAAAATACTGAAAAGAAAA
 GACTGAAAGAGTAGAAGATAAGGAGAAAAGTACGACAGAGACAAGGAAAGTAAGAGA
 GAGAGAGAGCTCTCCCAATTATAAAGCCATGAGCCCCCTTTGGTGGGGGTTTCTGCT
 CAGTTGCTTGGGCTGCAAAATCCTGCCAGGAGCCAGGGTCAGTTCCCCCGAGTCTG
 CATGACGGTGGACAGCCTAGTGAACAAGGAGTGCTGCCCACGCTGGGTGCAGAGTC
 GGCCAATGTCTGTGGCTCTCAGCAAGGCCGGGGGCAGTGCACAGAGGTGCGAGCCGA
 CACAAGGCCCTGGAGTGGTCCCTACATCCTACGAAACCAGGATGACCGTGAGCTGTG
 GCCAAGAAAATCTTCCACCGGACCTGCAAGTGCACAGGAACTTTGCCGGCTATAA
 TTGTGGAGACTGCAAGTTTGGCTGGACCGGTCCCAACTGCGAGCGGAAGAAACCACC
 AGTGATTGCGCAGAACATCCATTCCCTTGTGCTCCTCAGGAAAGAGAGCAGTTCTGGG
 CGCCTTAGATCTCGCGAAGAAGAGAGTACACCCCGACTACGTGATCACACACAACA
 CTGGCTGGGCCTGCTTGGGCCCAATGGAACCCAGCCGAGTTTGCCAAGTGCAGTGT
 TTATGATTTTTTTGTGTGGCTCCATTATTATTCTGTTAGAGATACATTATTAGGACC
 AGGACGCCCTACAGGGCCATAGATTTCTCACATCAAGGACCTGCATTTGTTACCTG
 GCACCGGTACCATTGTTGTGTCTGGAAAGAGATCTCCAGCGACTCATTTGGCAATGA

GTCTTTTGCTTTGCCCTACTGGAACCTTTGCCACTGGGAGGAACGAGTGTGATGTGTG
 TACAGACCAGCTGTTTGGGGCAGCGAGACCAGACGATCCGACTCTGATTAGTCGGAA
 CTCAAGATTCTCCAGCTGGGAACTGTCTGTGATAGCTTGGATGACTACAACCACCT
 GGTCACCTTGTGCAATGGAACCTATGAAGGTTTGTGAGAAGAAATCAAATGGGAAG
 AAACAGCATGAAATTGCCAACCTTAAAAGACATACGAGATTGCCTGTCTCTCCAGAA
 GTTTGACAATCCCTCCCTTCTTCCAGAACTCTACCTTCAGTTTCAGGAATGCTTTGGA
 AGGGTTTGATAAAGCAGATGGGACTCTGGATTCTCAAGTGATGAGCCTTCATAATTT
 GGTTTCATTCCTTCCTGAACGGGACAAACGCTTTGCCACATTTCAGCCGCCAATGATCC
 CATTTTTGTGGTGATTCTAATCGTTTGCTTTACAATGCTACAACAAACATCCTTGA
 ACATGTAAGAAAAGAGAAAGCGACCAAGGAACCTCCCTTCCCTGCATGTGCTGGTTCT
 TCATTCCCTTACTGATGCCATCTTTGATGAGTGGATGAAAAGATTTAATCCTCCTGC
 AGATGCCCTGGCTCAGGAGCTGGCCCTATTGGTCACAATCGGATGTACAACATGGT
 TCCTTTCTTCCCTCCAGTGACTAATGAAGAACTCTTTTAACTCAGACCAACTTGG
 CTACAGCTATGCCATCGATCTGCCAGTTTCAGTTGAAGAACTCCAGGTTGGCCAC
 AACTCTCTTAGTAGTCATGGGAACACTGGTGGCTTTGGTTGGTCTTTTTGTGCTGTT
 GGCTTTCTTCAATATAGAAGACTTCGAAAAGGATATACACCCCTAATGGAGACACA
 TTTAAGCAGCAAGAGATACACAGAAGAAGCCTAGGGTGCTCATGCCTTACCTAAGAG
 AAGAGGCTGGCCAAAGCCACAGTTCTGACGCTGACAATAAAGGAACATACTCCTACTG
 TTCCTTCTTGAGTTGAAGATCTTTGACATAGGTTCTTCTATAGTGATGATGATCTCA
 TTCAGAAGATGCTTAGCTGTAGTTTCCGCTTTGCTTGCTTGTTTAAACAAACCCAACT
 AAAGTGCTTGAGGCTACCTCTACCTTCAAATAAAGATAGACCTGACAATTTGTGATA
 TCTAATAATAACCCCCCCCCCAATATTGATTAAGCCTCCTCTTTTCTGAAAGCATT
 TAAAAAAA

Tabla 4A. TRP-2 Humana (SEQ ID NO: 5)

ATGAGCCCCCTTTGGTGGGGGTTTCTGCTCAGTTGCTTGGGCTGCAAAATCCTGCCA
 GGAGCCCAGGGTCAGTTCCCCCGAGTCTGCATGACGGTGGACAGCCTAGTGAACAAG
 GAGTGCTGCCACGCTGGGTGCAGAGTCGGCCAAATGTCTGTGGCTCTCAGCAAGGC
 CGGGGGCAGTGACAGAGGTGCGAGCCGACACAAGGCCCTGGAGTGGTCCCTACATC
 CTACGAAACCAGGATGACCGTGAGCTGTGGCCAAGAAAATCTTCCACCGGACCTGC
 AAGTGACACAGGAACTTTGCCGGCTATAATTGTGGAGACTGCAAGTTTGGCTGGACC
 GGTCCCAACTGCGAGCGGAAGAAACCACAGTGATTGGCAGAACATCCATTCTTG
 AGTCTCAGGAAAGAGAGCAGTTCTTGGGCGCCTTAGATCTCGCGAAGAAGAGAGTA
 CACCCCGACTACGTGATCACACACAACACTGGCTGGGCCTGCTTGGGCCCAATGGA
 ACCCAGCCGAGTTTGCCAACTGCAGTGTATGATTTTTTGTGTGGCTCCATTAT
 TATTCTGTTAGAGATACATTATTAGGACCAGGACGCCCTACAGGGCCATAGATTTT
 TCACATCAAGGACCTGCATTTGTTACCTGGCACCGGTACCATTTGTTGTGTCTGGAA
 AGAGATCTCCAGCGACTCATTGGCAATGAGTCTTTTGCTTTGCCCTACTGGAACCTT
 GCCACTGGGAGGAACGAGTGTGATGTGTGTACAGACCAGCTGTTTGGGGCAGCGAGA
 CCAGACGATCCGACTCTGATTAGTCGGAACCTCAAGATTCTCCAGCTGGGAACTGTC
 TGTGATAGCTTGGATGACTACAACCACCTGGTCACCTTGTGCAATGGAACCTATGAA
 GGTTTGCTGAGAAGAAATCAAATGGGAAGAAACAGCATGAAATTGCCAACCTTAAAA
 GACATACGAGATTGCCTGTCTCTCCAGAAGTTTGACAATCCTCCCTTCTTCCAGAAC
 TCTACCTTCAGTTTCAGGAATGCTTTGGAAGGGTTTGATAAAGCAGATGGGACTCTG
 GATTCTCAAGTGATGAGCCTTCATAATTTGGTTTCATTCTCTCCTGAACGGGACAAAC
 GCTTTGCCACATTCAGCCGCCAATGATCCCATTTTTGTGGTTCTTCATTCTTTACT
 GATGCCATCTTTGATGAGTGGATGAAAAGATTTAATCCTCCTGCAGATGCCTGGCCT
 CAGGAGCTGGCCCTATTGGTCACAATCGGATGTACAACATGGTTCTTTCTTCCCT
 CCAGTGACTAATGAAGAACTCTTTTAACTCAGACCAACTTGGCTACAGCTATGCC
 ATCGATCTGCCAGTTTTCAGTTGAAGAACTCCAGGTTGGCCACAACCTCTCTTAGTA
 GTCATGGGAACACTGGTGGCTTTGGTTGGTCTTTTTGTGCTGTTGGCTTTTCTTCAA
 TATAGAAGACTTCGAAAAGGATATACACCCCTAATGGAGACACATTTAAGCAGCAAG
 AGATACACAGAAGAAGCCTAG

Tabla 4B. Secuencia de Aminoácidos de TRP2 Humana (SEQ ID NO: 6)

Met Ser Pro Leu Trp Trp Gly Phe Leu Leu Ser Cys Leu Gly Cys Lys
 Ile Leu Pro Gly Ala Gln Gly Gln Phe Pro Arg Val Cys Met Thr Val
 Asp Ser Leu Val Asn Lys Glu Cys Cys Pro Arg Leu Gly Ala Glu Ser
 Ala Asn Val Cys Gly Ser Gln Gln Gly Arg Gly Gln Cys Thr Glu Val
 Arg Ala Asp Thr Arg Pro Trp Ser Gly Pro Tyr Ile Leu Arg Asn Gln
 Asp Asp Arg Glu Leu Trp Pro Arg Lys Phe Phe His Arg Thr Cys Lys
 Cys Thr Gly Asn Phe Ala Gly Tyr Asn Cys Gly Asp Cys Lys Phe Gly
 Trp Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Lys Lys Pro Pro Val Ile Arg Gln
 Asn Ile His Ser Leu Ser Pro Gln Glu Arg Glu Gln Phe Leu Gly Ala
 Leu Asp Leu Ala Lys Lys Arg Val His Pro Asp Tyr Val Ile Thr Thr
 Gln His Trp Leu Gly Leu Leu Gly Pro Asn Gly Thr Gln Pro Gln Phe
 Ala Asn Cys Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu His Tyr Tyr Ser
 Val Arg Asp Thr Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg Ala Ile Asp
 Phe Ser His Gln Gly Pro Ala Phe Val Thr Trp His Arg Tyr His Leu
 Leu Cys Leu Glu Arg Asp Leu Gln Arg Leu Ile Gly Asn Glu Ser Phe
 Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Phe Ala Thr Gly Arg Asn Glu Cys Asp Val
 Cys Thr Asp Gln Leu Phe Gly Ala Ala Arg Pro Asp Asp Pro Thr Leu
 Ile Ser Arg Asn Ser Arg Phe Ser Ser Trp Glu Thr Val Cys Asp Ser
 Leu Asp Asp Tyr Asn His Leu Val Thr Leu Cys Asn Gly Thr Tyr Glu
 Gly Leu Leu Arg Arg Asn Gln Met Gly Arg Asn Ser Met Lys Leu Pro
 Thr Leu Lys Asp Ile Arg Asp Cys Leu Ser Leu Gln Lys Phe Asp Asn
 Pro Pro Phe Phe Gln Asn Ser Thr Phe Ser Phe Arg Asn Ala Leu Glu
 Gly Phe Asp Lys Ala Asp Gly Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Ser Leu
 His Asn Leu Val His Ser Phe Leu Asn Gly Thr Asn Ala Leu Pro His
 Ser Ala Ala Asn Asp Pro Ile Phe Val Val Leu His Ser Phe Thr Asp
 Ala Ile Phe Asp Glu Trp Met Lys Arg Phe Asn Pro Pro Ala Asp Ala

Trp Pro Gln Glu Leu Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Met Tyr Asn Met
Val Pro Phe Phe Pro Pro Val Thr Asn Glu Glu Leu Phe Leu Thr Ser
Asp Gln Leu Gly Tyr Ser Tyr Ala Ile Asp Leu Pro Val Ser Val Glu
Glu Thr Pro Gly Trp Pro Thr Thr Leu Leu Val Val Met Gly Thr Leu
Val Ala Leu Val Gly Leu Phe Val Leu Leu Ala Phe Leu Gln Tyr Arg
Arg Leu Arg Lys Gly Tyr Thr Pro Leu Met Glu Thr His Leu Ser Ser
Lys Arg Tyr Thr Glu Glu Ala

Varias secuencias de TRP2 están disponibles al público a través de la red de redes. Los ejemplos en el sitio NCBI incluyen, pero no están limitados a, humana (NM_01129889, DQ 902581, BC028311, L 18967, DQ894649.3, DQ891466), de oveja (NM_001130024), de cerdo (AB207241.1), de ganado (NM_00101012666, AY278108), de caballo (XM_001491619), de macaco (M_001083014, XM_001083129, XM_001082890) y de perro (XM_542639.2).

5

Listado de secuencias

<110> AlphaVax, Inc. Wolchok, Jedd D. Avogadri, Francesca Olmsted, Robert A. Maughan, Maureen

5 <120> PARTÍCULAS DE REPLICÓN DE ALFAVIRUS QUE EXPRESAN TRP2 Y MÉTODOS

<130> 41-09 WO

<140> no asignado

10 <141> 2010-04-01

<150> US 61/167.774

<151> 2009-04-08

15 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 517

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

25

Met Gly Leu Val Gly Trp Gly Leu Leu Leu Gly Cys Leu Gly Cys Gly
1 5 10 15

Ile Leu Leu Arg Ala Arg Ala Gln Phe Pro Arg Val Cys Met Thr Leu
20 25 30

Asp Gly Val Leu Asn Lys Glu Cys Cys Pro Pro Leu Gly Pro Glu Ala
35 40 45

Thr Asn Ile Cys Gly Phe Leu Glu Gly Arg Gly Gln Cys Ala Glu Val
50 55 60

Gln Thr Asp Thr Arg Pro Trp Ser Gly Pro Tyr Ile Leu Arg Asn Gln
65 70 75 80

Asp Asp Arg Glu Gln Trp Pro Arg Lys Phe Phe Asn Arg Thr Cys Lys
85 90 95

Cys Thr Gly Asn Phe Ala Gly Tyr Asn Cys Gly Gly Cys Lys Phe Gly
100 105 110

Trp Thr Gly Pro Asp Cys Asn Arg Lys Lys Pro Ala Ile Leu Arg Arg
115 120 125

Asn Ile His Ser Leu Thr Ala Gln Glu Arg Glu Gln Phe Leu Gly Ala
130 135 140

Leu Asp Leu Ala Lys Lys Ser Ile His Pro Asp Tyr Val Ile Thr Thr
 145 150 155 160

Gln His Trp Leu Gly Leu Leu Gly Pro Asn Gly Thr Gln Pro Gln Ile
 165 170 175

Ala Asn Cys Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu His Tyr Tyr Ser
 180 185 190

Val Arg Asp Thr Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Lys Ala Ile Asp
 195 200 205

Phe Ser His Gln Gly Pro Ala Phe Val Thr Trp His Arg Tyr His Leu
 210 215 220

Leu Trp Leu Glu Arg Glu Leu Gln Arg Leu Thr Gly Asn Glu Ser Phe
 225 230 235 240

Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Phe Ala Thr Gly Lys Asn Glu Cys Asp Val
 245 250 255

Cys Thr Asp Asp Trp Leu Gly Ala Ala Arg Gln Asp Asp Pro Thr Leu
 260 265 270

Ile Ser Arg Asn Ser Arg Phe Ser Thr Trp Glu Ile Val Cys Asp Ser
 275 280 285

Leu Asp Asp Tyr Asn Arg Arg Val Thr Leu Cys Asn Gly Thr Tyr Glu
 290 295 300

Gly Leu Leu Arg Arg Asn Lys Val Gly Arg Asn Asn Glu Lys Leu Pro
 305 310 315 320

Thr Leu Lys Asn Val Gln Asp Cys Leu Ser Leu Gln Lys Phe Asp Ser
 325 330 335

Pro Pro Phe Phe Gln Asn Ser Thr Phe Ser Phe Arg Asn Ala Leu Glu
 340 345 350

Gly Phe Asp Lys Ala Asp Gly Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Asn Leu
 355 360 365

His Asn Leu Ala His Ser Phe Leu Asn Gly Thr Asn Ala Leu Pro His
 370 375 380

Ser Ala Ala Asn Asp Pro Val Phe Val Val Leu His Ser Phe Thr Asp
 385 390 395 400

Ala Ile Phe Asp Glu Trp Leu Lys Arg Asn Asn Pro Ser Thr Asp Ala

405	410	415
Trp Pro Gln Glu Leu Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Met Tyr Asn Met		
420	425	430
Val Pro Phe Phe Pro Pro Val Thr Asn Glu Glu Leu Phe Leu Thr Ala		
435	440	445
Glu Gln Leu Gly Tyr Asn Tyr Ala Val Asp Leu Ser Glu Glu Glu Ala		
450	455	460
Pro Val Trp Ser Thr Thr Leu Ser Val Val Ile Gly Ile Leu Gly Ala		
465	470	475
Phe Val Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala Phe Leu Gln Tyr Arg Arg Leu		
485	490	495
Arg Lys Gly Tyr Ala Pro Leu Met Glu Thr Gly Leu Ser Ser Lys Arg		
500	505	510
Tyr Thr Glu Glu Ala		
515		

<210> 2
 <211> 1554
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 2

5

atgggacttg taggatgggg acttttggtg ggatgtttgg gatgtggaat cctgctgcgc	60
gcccagagctc aattccccag agtgtgtatg acccttgacg ggggtgctgaa caaagaatgc	120
tgtcctcccc tcggcccaga ggcaactaat atttgcggtc tcttggaagg caggggacag	180
tgtgccgagg tccagaccga tacaaggccc tgggtccgggc catacattct tcggaatcaa	240
gatgacaggg aacagtggcc tcggaagtcc ttcaaccgga cctgcaaata cacaggaaat	300
tttgacaggtg ataattgcgg cggatgtaag ttccgggtgga ctggcccaga ttgtaataga	360
aagaagcctg ctatcctgag gcggaacatt cacagtgtga cagctcagga gagagagcag	420
tttctgggtg ccctcgattt ggccaagaag agtattcatc ctgattatgt gataactact	480
caacattggc tgggactgct cggtcctaac gggacacaac ctgagatcgc caactgttct	540
gtgtacgact tcttcgtgtg gcttcactat tacagcgtcc gggacactct cctcggacct	600
gggcgcctt ataaagcaat cgacttctcc catcagggtc cagcatttgt cacttggcac	660
cgctaccatc tgctctggct tgagcgcgag ttgcagcgac tgaccgggaa tgagtcattt	720
gcactgcctt actggaattt tgcaacaggc aagaatgagt gtgatgtttg cactgatgat	780
tggctcggag ccgcaaggca ggatgacctt actctcatca gccggaatag ccggttttcc	840
acctgggaga ttgtgtgtga tagtttggtg gactacaaca ggcgcgtgac actgtgtaat	900
gggacatacg agggactcct gcgcgggaat aagggtgggac gcaacaatga aaagctgccc	960
acgctgaaga atgtgcagga ttgcctgagc cttcagaaat tcgattcccc accattcttt	1020
cagaactcca cttctctttt tcgaaatgca cttgaggggt ttgacaaggc cgatgggact	1080
ttggattctc aggttatgaa ttgacacaa cttggcgcaca gcttcctgaa cggaaccaat	1140
gcattgccgc actccgctgc aaacgatccc gtgtttgtgg tctccattc ctttacggac	1200
gctatatttg atgaatggtt gaaaagaaat aatccttcaa ccgacgcgtg gcccgaagag	1260
cttgctccga ttggccataa caggatgtat aatatggtgc ccttctttcc tcccgtgact	1320
aatgaagagc ttttcttgac cgcagagcag ctccgctata attatgccgt agaccttagt	1380
gaggaagagg ctcccgtgtg gagcaccact ctctcagtgg tgatagggat cttgggcgcg	1440
tttgtactgc tgctgggcct gcttgcttcc ttgcagtaca ggaggctgag gaagggatat	1500
gctcctttga tggaaaccgg tttgtctagc aaaagatata ccgagggaagc atga	1554

<210> 3

<211> 4743

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

aactgagttc aaggcaatta aagtcaagag ctaaggaggg agggagaggg tttagaaata	60
ccagcataat aagtagtatg actgggtgct ctgtaaatta actcaattag acaaagcctg	120
acttaacggg ggaagatggt gagaagcgct accctcatta aatttggttg ttagagggcg	180
ttctaaggaa attaagtctg ttagttgttt gaatcacata aaattgtgtg tgcacgttca	240
tgtacacatg tgcacacatg taacctctgt gattcttggt ggtatttttt taagaagaaa	300
ggaatagaaa gcaaagaaaa ataaaaata ctgaaaagaa aagactgaaa gagtagaaga	360
taaggagaaa agtacgacag agacaaggaa agtaagagag agagagagct ctcccaatta	420
taaagccatg agcccccttt ggtggggggt tctgctcagt tgcttgggct gcaaaatcct	480
gccaggagcc cagggtcagt tcccccgagt ctgcatgacg gtggacagcc tagtgaacaa	540
ggagtgctgc ccacgcctgg gtgcagagtc ggccaatgct tgtggctctc agcaaggccg	600
ggggcagtg acagaggtgc gagccgacac aaggccctgg agtggtcctt acatcctacg	660
aaaccaggat gaccgtgagc tgtggccaag aaaattcttc caccggacct gcaagtgcac	720
aggaaacttt gccggctata attgtggaga ctgcaagttt ggctggaccg gtcccaactg	780
cgagcggaa agaaaccaccag tgattcggca gaacatccat tccttgagtc ctcaggaaaag	840
agagcagttc ttgggcgcct tagatctcgc gaagaagaga gtacaccccg actacgtgat	900
caccacacaa cactggctgg gcctgcttgg gcccaatgga acccagccgc agtttgccaa	960
ctgcagtgtt tatgattttt ttgtgtggct ccattattat tctgttagag atacattatt	1020

aggaccagga cgccctaca gggccataga tttctcacat caaggacctg catttggttac	1080
ctggcaccgg taccatttgt tgtgtctgga aagagatctc cagcgactca ttggcaatga	1140
gtcttttgct ttgccctact ggaactttgc cactgggagg aacgagtgtg atgtgtgtac	1200
agaccagctg ttgggggcag cgagaccaga cgatccgact ctgattagtc ggaactcaag	1260
attctccagc tgggaaactg tctgtgatag cttggatgac tacaaccacc tggtcacctt	1320
gtgcaatgga acctatgaag gtttctgag aagaaatcaa atgggaagaa acagcatgaa	1380
attgccaaac ttaaaagaca tacgagattg cctgtctctc cagaagtttg acaatcctcc	1440
cttcttccag aactctacct tcagtttcag gaatgctttg gaagggtttg ataaagcaga	1500
tgggactctg gattctcaag tgatgagcct tcataatttg gttcattcct tcctgaacgg	1560
gacaaacgct ttgccacatt cagccgccaa tgatccatt tttgtggtga tttctaactg	1620
tttgctttac aatgctacaa caaacatcct tgaacatgta agaaaagaga aagcgaccaa	1680
ggaactccct tccctgcatg tctgtgttct tcattccttt actgatgcca tctttgatga	1740
gtggatgaaa agatttaatc ctctgcaga tgcctggcct caggagctgg cccctattgg	1800
tcacaatcgg atgtacaaca tggttccttt ctccctcca gtgactaatg aagaactctt	1860
tttaacctca gaccaacttg gctacagcta tgccatcgat ctgccagttt cagttgaaga	1920
aactccaggt tggcccacaa ctctcttagt agtcatggga aactgggtgg ctttggttgg	1980
tctttttgtg ctgttggtt ttcttcaata tagaagactt cgaaaaggat atacaccct	2040
aatggagaca catttaagca gcaagagata cacagaagaa gcctaggggtg ctcatgcctt	2100
acctaagaga agaggctggc caagccacag ttctgacgct gacaataaag gaactaatcc	2160
tcactgttcc ttcttgagtt gaagatcttt gacatagggtt cttctatagt gatgatgatc	2220
tcattcagaa gatgcttagc tgtagtttcc gctttgcttg cttgtttaac aaacccaact	2280
aaagtgcctg aggctacctc taccttcaaa taaagataga cctgacaatt tgtgatatct	2340
aactgagttc aaggcaatta aagtcaagag ctaaggaggg agggagaggg tttagaaata	2400
ccagcataat aagtagtatg actgggtgct ctgtaaatta actcaattag acaaagcctg	2460
acttaacggg ggaagatggt gagaagcgct accctcatta aatttggttg ttagaggcgc	2520
ttctaaggaa attaatgtctg ttagttgttt gaatcacata aaattgtgtg tgcacgttca	2580
tgtacacatg tgcacacatg taacctctgt gattcttctg ggtatttttt taagaagaaa	2640
ggaatagaaa gcaaagaaaa ataaaaata ctgaaaagaa aagactgaaa gagtagaaga	2700
taaggagaaa agtacgacag agacaaggaa agtaagagag agagagagct ctcccaatta	2760
taaagccatg agcccccttt ggtgggggtt tctgctcagt tgcctgggct gcaaaatcct	2820
gccaggagcc cagggtcagt tccccgagt ctgcatgacg gtggacagcc tagtgaacaa	2880
ggagtgtctc ccacgcctgg gtgcagagtc ggccaatgtc tgtggctctc agcaaggccg	2940
ggggcagtgc acagaggtgc gagccgacac aaggccctgg agtggctcct acatcctacg	3000

aaaccaggat gaccgtgagc tgtggccaag aaaattcttc caccggacct gcaagtgcac	3060
aggaaacttt gccggtata attgtggaga ctgcaagttt ggctggaccg gtcccaactg	3120
cgagcgggaag aaaccaccag tgattcggca gaacatccat tccttgagtc ctcaggaaag	3180
agagcagttc ttgggcgcct tagatctcgc gaagaagaga gtacaccccg actacgtgat	3240
caccacacaa cactggctgg gcctgcttgg gcccaatgga acccagccgc agtttgccaa	3300
ctgcagtgtt tatgattttt ttgtgtggct ccattattat tctgttagag atacattatt	3360
aggaccagga cgccctaca gggccataga tttctcacat caaggacctg catttggtac	3420
ctggcaccgg taccatttgt tgtgtctgga aagagatctc cagcgactca ttggcaatga	3480
gtcttttgct ttgccctact ggaactttgc cactgggagg aacgagtgtg atgtgtgtac	3540
agaccagctg ttggggcag cgagaccaga cgatccgact ctgattagtc ggaactcaag	3600
attctccagc tgggaaactg tctgtgatag cttggatgac tacaaccacc tggtcacctt	3660
gtgcaatgga acctatgaag gtttgctgag aagaaatcaa atgggaagaa acagcatgaa	3720
attgccaaacc ttaaaagaca tacgagattg cctgtctctc cagaagtttg acaatcctcc	3780
cttcttccag aactctacct tcagtttcag gaatgctttg gaagggtttg ataaagcaga	3840
tgggactctg gattctcaag tgatgagcct tcataatttg gttcattcct tcctgaacgg	3900
gacaaacgct ttgccacatt cagccgccaa tgatcccat tttgtggtga tttctaactg	3960
tttgctttac aatgctacaa caaacatcct tgaacatgta agaaaagaga aagcgaccaa	4020
ggaactccct tccctgcatg tgctggttct tcattccttt actgatgcca tctttgatga	4080
gtggatgaaa agatttaatc ctctgcaga tgccctggcct caggagctgg cccctattgg	4140
tcacaatcgg atgtacaaca tggttccttt cttccctcca gtgactaatg aagaactctt	4200
tttaacctca gaccaacttg gctacagcta tgccatcgat ctgccagttt cagttgaaga	4260
aactccaggt tggccacaaa ctctcttagt agtcatggga aactggtgg ctttggttgg	4320
tctttttgtg ctgttggett ttcttcaata tagaagactt cgaaaaggat atacaccctt	4380
aatggagaca catttaagca gcaagagata cacagaagaa gcctagggtg ctcatgcctt	4440
acctaagaga agaggtggc caagccacag ttctgacgct gacaataaag gaactaatcc	4500
tcactgttcc ttcttgagtt gaagatcttt gacataggtt cttctatagt gatgatgac	4560
tcattcagaa gatgcttagc tgtagtttcc gctttgcttg cttgtttaac aaaccaact	4620
aaagtgcttg aggctacctc taccttcaaa taaagataga cctgacaatt tgtgatatct	4680
aataataacc ccccccccaa tattgattaa gcctcctcct tttctgaaag catttaaaaa	4740
aaa	4743

<210> 4

<211> 3911

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

aactgagttc aaggcaatta aagtcaagag ctaaggaggg agggagaggg ttagaaata	60
ccagcataat aagtagtatg actgggtgct ctgtaaatta actcaattag acaaagcctg	120
acttaacggg ggaagatggt gagaagcgct accctcatta aatttggttg ttagaggcgc	180
ttctaaggaa attaagtctg ttagttgttt gaatcacata aaattgtgtg tgcacgttca	240
tgtacacatg tgcacacatg taacctctgt gattcttgtg ggtatttttt taagaagaaa	300
ggaatagaaa gcaaagaaaa ataaaaata ctgaaaagaa aagactgaaa gagtagaaga	360
taaggagaaa agtacgacag agacaaggaa agtaagagag agagagagct ctcccaatta	420
taaagccatg agcccccttt ggtgggggtt tctgctcagt tgcttgggct gcaaatcct	480
gccaggagcc cagggctcagt tccccgagt ctgcatgacg gtggacagcc tagtgaacaa	540
ggagtgtctc ccacgcctgg gtgcagagtc ggccaatgtc tgtggtctc agcaaggccg	600
ggggcagtc acagaggtgc gagccgacac aaggccctgg agtggtcct acatcctacg	660
aaaccaggat gaccgtgagc tgtggccaag aaaattcttc caccggacct gcaagtgcac	720
aggaaacttt gccggctata attgtggaga ctgcaagttt ggctggaccg gtcccaactg	780
cgagcggaag aaaccaccag tgattcggca gaacatccat tccttgagtc ctcaggaaag	840
agagcagttc ttgggcgcct tagatctcgc gaagaagaga gtacaccccg actacgtgat	900
caccacacaa cactggctgg gcctgcttgg gcccaatgga acccagccgc agtttgcaa	960
ctgcagtgtt tatgattttt ttgtgtggct ccattattat tctgttagag atacattatt	1020
aggaccagga cgcccctaca gggccataga tttctcacat caaggacctg catttgttac	1080
ctggcaccgg taccatttgt tgtgtctgga aagagatctc cagcgactca ttggcaatga	1140
gtcttttgct ttgccctact ggaactttgc cactgggagg aacgagtgtg atgtgtgtac	1200
agaccagctg tttggggcag cgagaccaga cgatccgact ctgattagtc ggaactcaag	1260
attctccagc tgggaaactg tctgtgatag cttggatgac tacaaccacc tggtcacctt	1320
gtgcaatgga acctatgaag gtttgcctgag aagaaatcaa atgggaagaa acagcatgaa	1380
attgccaaac ttaaagaca tacgagattg cctgtctctc cagaagtttg acaatcctcc	1440
cttcttccag aactctacct tcagtttcag gaatgctttg gaagggtttg ataaagcaga	1500
tgggactcaa ctgagttcaa ggcaattaaa gtcaagagct aaggagggag ggagagggtt	1560
tagaaatacc agcataataa gtagtatgac tgggtgctct gtaaattaac tcaattagac	1620
aaagcctgac ttaacggggg aagatggtga gaagcgctac cctcattaaa tttggttgtt	1680
agaggcgctt ctaaggaaat taagtctgtt agttgtttga atcacataaa attgtgtgtg	1740
cacgttcatg tacacatgtg cacacatgta acctctgtga ttcttgtggg tattttttta	1800
agaagaaagg aatagaaagc aaagaaaaat aaaaaatact gaaagaaaa gactgaaaga	1860

gtagaagata	aggagaaaag	tacgacagag	acaaggaaaag	taagagagag	agagagctct	1920
cccaattata	aagccatgag	cccccttttg	tgggggtttc	tgctcagttg	cttgggctgc	1980
aaaatcctgc	caggagccca	gggtcagttc	ccccgagtct	gcatgacggt	ggacagccta	2040
gtgaacaagg	agtgtctgcc	acgcctgggt	gcagagtcgg	ccaatgtctg	tggctctcag	2100
caaggccggg	ggcagtgcac	agaggtgcga	gccgacacaa	ggccctggag	tggtcacctac	2160
atcctacgaa	accaggatga	ccgtgagctg	tggccaagaa	aattcttcca	ccggacctgc	2220
aagtgcacag	gaaactttgc	cggtataat	tgtggagact	gcaagtttgg	ctggaccggt	2280
cccaactgcg	agcgggaagaa	accaccagtg	attcggcaga	acatccattc	cttgagtcct	2340
caggaaagag	agcagttctt	gggcgcctta	gatctcgca	agaagagagt	acaccccgac	2400
tacgtgatca	ccacacaaca	ctggctgggc	ctgcttgggc	ccaatggaac	ccagccgcag	2460
tttgccaact	gcagtgttta	tgattttttt	gtgtggctcc	attattattc	tgttagagat	2520
acattattag	gaccaggacg	cccctacagg	gccatagatt	tctcacatca	aggacctgca	2580
tttgttacct	ggcaccggta	ccatttgttg	tgtctgaaa	gagatctcca	gcgactcatt	2640
ggcaatgagt	cttttgcttt	gccctactgg	aactttgcca	ctgggaggaa	cgagtgtgat	2700
gtgtgtacag	accagctgtt	tggggcagcg	agaccagacg	atccgactct	gattagtcgg	2760
aactcaagat	tctccagctg	ggaaactgtc	tgtgatagct	tggatgacta	caaccacctg	2820
gtcaccttgt	gcaatggaac	ctatgaagg	ttgtcgagaa	gaaatcaa	gggaagaaac	2880
agcatgaaat	tgccaacctt	aaaagacata	cgagattgcc	tgtctctcca	gaagtttgac	2940
aatcctccct	tcttcagaa	ctctaccttc	agtttcagga	atgctttgga	agggtttgat	3000
aaagcagatg	ggactctgga	ttctcaagtg	atgagccttc	ataatttgg	tcattccttc	3060
ctgaacggga	caaacgcttt	gccacattca	gccgccaatg	atcccatttt	tgtggtgatt	3120
tctaatacgtt	tgctttacaa	tgctacaaca	aacatccttg	aacatgtaag	aaaagagaaa	3180
gcgaccaagg	aactcccttc	cctgcatgtg	ctggttcttc	attcctttac	tgatgccatc	3240
tttgatgagt	ggatgaaaag	atttaatcct	cctgcagatg	cctggcctca	ggagctggcc	3300
cctattggtc	acaatcggat	gtacaacatg	gttcctttct	tccctccagt	gactaatgaa	3360
gaactctttt	taacctcaga	ccaacttggc	tacagctatg	ccatcgatct	gccagtttca	3420
gttgaagaaa	ctccaggttg	gcccacaact	ctcttagtag	tcatgggaac	actggtggct	3480
ttggttggtc	tttttggtg	gttggtttt	cttcaatata	gaagacttcg	aaaaggatat	3540
acacccctaa	tggagacaca	tttaagcagc	aagagataca	cagaagaagc	ctaggggtgct	3600
catgccttac	ctaagagaag	aggctggcca	agccacagtt	ctgacgctga	caataaagga	3660
actaatcctc	actgttcctt	cttgagttga	agatctttga	cataggttct	tctatagtga	3720
tgatgatctc	attcagaaga	tgcttagctg	tagtttccgc	tttgcttgct	tgtttaacaa	3780
acccaactaa	agtgtttgag	gctacctcta	ccttcaata	aagatagacc	tgacaatttg	3840
tgatatctaa	taataacccc	cccccaata	ttgattaagc	ctcctccttt	tctgaaagca	3900
tttaaaaaaa	a					3911

ES 2 540 958 T3

<210> 5
 <211> 1560
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 5

```

atgagccccc tttggtggg gtttctgctc agttgcttgg gctgcaaaat cctgccagga      60
gccacaggtc agttcccccg agtctgcatg acggtggaca gcctagtga caaggagtgc      120
tgcccacgcc tgggtgcaga gtcggccaat gtctgtggct ctacagcaagg ccgggggcag      180
tgacacagagg tgcgagccga cacaaggccc tggagtggtc cctacatcct acgaaaccag      240
gatgaccgtg agctgtggcc aagaaaattc ttccaccgga cctgcaagtg cacaggaaac      300
tttgccggct ataattgtgg agactgcaag tttggctgga ccggtcccaa ctgagagcgg      360
aagaaaccac cagtgattcg gcagaacatc cattccttga gtccctcagga aagagagcag      420
ttcttgggcg ccttagatct cgcgaagaag agagtacacc ccgactacgt gatcaccaca      480
caacactggc tgggcctgct tgggccaat ggaaccagc cgcagtttgc caactgcagt      540
gtttatgatt tttttgtgtg gctccattat tattctgtta gagatacatt attaggacca      600
ggacgccctt acagggccat agatttctca catcaaggac ctgcatttgt tacctggcac      660
cgggtaccatt tgttgtgtct ggaaagagat ctccagcgac tcattggcaa tgagtctttt      720
gctttgccct actggaactt tgccactggg aggaacgagt gtgatgtgtg tacagaccag      780
ctgtttgggg cagcgagacc agacgatccg actctgatta gtcggaactc aagattctcc      840
agctgggaaa ctgtctgtga tagcttggat gactacaacc acctggtcac cttgtgcaat      900
ggaacctatg aaggtttgct gagaagaaat caaatgggaa gaaacagcat gaaattgcca      960
accttaaaag acatacgaga ttgcctgtct ctccagaagt ttgacaatcc tcccttcttc     1020
cagaactcta ccttcagttt caggaatgct ttggaagggt ttgataaagc agatgggact     1080
ctggattctc aagtgatgag ccttcataat ttggttcatt ccttcctgaa cgggacaaac     1140
gctttgccac attcagccgc caatgatccc atttttgtgg ttcttcattc ctttactgat     1200
gccatctttg atgagtggat gaaaagattt aatcctcctg cagatgcctg gcctcaggag     1260
ctggccccta ttggtcacia tcggatgtac aacatgggtc ctttcttccc tccagtgact     1320
aatgaagaac tctttttaac ctacagacaa cttggctaca gctatgccat cgatctgcca     1380
gtttcagttg aagaaactcc aggttggccc acaactctct tagtagtcat gggaaactg      1440
gtggcttttg ttggtctttt tgtgctgttg gcttttcttc aatatagaag acttcgaaaa     1500
ggatatacac ccctaattga gacacattta agcagcaaga gatacacaga agaagcctag     1560

```

10

<210> 6
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 6

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

Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Phe Ala Thr Gly Arg Asn Glu Cys Asp Val
245 250 255

Cys Thr Asp Gln Leu Phe Gly Ala Ala Arg Pro Asp Asp Pro Thr Leu
260 265 270

Ile Ser Arg Asn Ser Arg Phe Ser Ser Trp Glu Thr Val Cys Asp Ser
275 280 285

Leu Asp Asp Tyr Asn His Leu Val Thr Leu Cys Asn Gly Thr Tyr Glu
290 295 300

Gly Leu Leu Arg Arg Asn Gln Met Gly Arg Asn Ser Met Lys Leu Pro
305 310 315 320

Thr Leu Lys Asp Ile Arg Asp Cys Leu Ser Leu Gln Lys Phe Asp Asn
325 330 335

Pro Pro Phe Phe Gln Asn Ser Thr Phe Ser Phe Arg Asn Ala Leu Glu
340 345 350

Gly Phe Asp Lys Ala Asp Gly Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Ser Leu
355 360 365

His Asn Leu Val His Ser Phe Leu Asn Gly Thr Asn Ala Leu Pro His
370 375 380

Ser Ala Ala Asn Asp Pro Ile Phe Val Val Leu His Ser Phe Thr Asp
385 390 395 400

Ala Ile Phe Asp Glu Trp Met Lys Arg Phe Asn Pro Pro Ala Asp Ala
405 410 415

Trp Pro Gln Glu Leu Ala Pro Ile Gly His Asn Arg Met Tyr Asn Met
420 425 430

Val Pro Phe Phe Pro Pro Val Thr Asn Glu Glu Leu Phe Leu Thr Ser
435 440 445

Asp Gln Leu Gly Tyr Ser Tyr Ala Ile Asp Leu Pro Val Ser Val Glu
450 455 460

Glu Thr Pro Gly Trp Pro Thr Thr Leu Leu Val Val Met Gly Thr Leu
465 470 475 480

Val Ala Leu Val Gly Leu Phe Val Leu Leu Ala Phe Leu Gln Tyr Arg
485 490 495

Arg Leu Arg Lys Gly Tyr Thr Pro Leu Met Glu Thr His Leu Ser Ser
500 505 510

Lys Arg Tyr Thr Glu Glu Ala
515

5 <210> 7
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética: cebador directo EcoR5 de TRP-2 humana
<400> 7

gagcccccctt tgggtgggggt ttctgctcag ttgcttgg 38

15 <210> 8
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética: cebador inverso Xba/PacI de TRP-2 humana
<400> 8

25 **ggatggctct agattaatta attactaggc ttctctgtg tatc 44**

30 <210> 9
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción sintética: cebador para TRP2 humana

35 <400> 9

gagcccccctt tgggtgggggt ttctgctcag ttgcttgg 38

40 <210> 10
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética: cebador inverso para TRP2 humana
<400> 10

ggatggctct agattaatta attactaggc ttctctgtg tatc 44

50

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de partículas de replicón de alfavirus que dirigen la expresión de dopacromo tautomerasa (TRP2) en un sujeto humano o animal, para uso en el aumento o inducción de una respuesta inmune frente a células de melanoma en el sujeto, en el que no hay antígenos de melanoma distintos del TRP2, y no hay ácidos nucleicos que dirigen la expresión de antígenos de melanoma distintos del TRP2, en la composición farmacéutica.
2. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en el que la partícula de replicón de alfavirus es una partícula de replicón del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEE);
en el que el alfavirus es, opcionalmente, un alfavirus atenuado;
- en el que el alfavirus atenuado es, más opcionalmente, VEE TC-83.
3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de partículas de replicón de alfavirus que expresan dopacromo tautomerasa (TRP2), para uso en un método para reducir el riesgo de contraer melanoma en un sujeto humano o animal o reducir la gravedad o retrasar la progresión de melanoma en un sujeto humano o animal con melanoma, en el que no hay antígenos de melanoma distintos del TRP2, y no hay ácidos nucleicos que dirigen la expresión de antígenos de melanoma distintos del TRP2, en la composición farmacéutica.
4. Una composición inmunogénica comprende partículas de replicón de alfavirus que expresan dopacromo tautomerasa (TRP2), en el que no hay antígenos de melanoma distintos del TRP2, y no hay ácidos nucleicos que dirigen la expresión de antígenos de melanoma distintos del TRP2, en la composición inmunogénica, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 3 o la composición inmunogénica de la reivindicación 4, en el que la partícula de replicón de alfavirus es una partícula de replicón del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEE).
6. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 3 o la composición inmunogénica de la reivindicación 4, en el que la partícula de replicón de alfavirus es una partícula de replicón del virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEE);
en el que el VEE es un VEE atenuado.
7. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, o reivindicación 5 ó 6 cuando depende de la reivindicación 3, en el que la composición farmacéutica se administra subcutáneamente, intramuscularmente, intradérmicamente o intravenosamente;
- en el que la composición farmacéutica se administra, opcionalmente, subcutáneamente o intramuscularmente.
8. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1 ó 3 o reivindicación 7 cuando depende de la reivindicación 3, en el que el TRP2 deriva en secuencia de la misma especie que el sujeto.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 4 que comprende además un adyuvante inmunológico.
10. La composición inmunogénica de la reivindicación 4 que comprende además un adyuvante inmunológico, y que comprende además una citoquina.
11. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, 9 ó 10, para uso en un método para reducir el tamaño del tumor de melanoma, reducir o retrasar la recurrencia de un tumor de melanoma o metástasis de melanoma, y/o reducir o prevenir metástasis de melanoma en un sujeto, comprendiendo dicho uso la etapa de administrar una única dosis de la composición inmunogénica.
12. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y reivindicaciones 5 a 8 cuando depende de la reivindicación 3, que comprende además una etapa posterior de administrar una segunda dosis de una composición farmacéutica que comprende proteína TRP2 o que comprende un ácido nucleico capaz de expresar TRP2 en el sujeto.
13. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 12, en el que la modalidad de la segunda dosis se selecciona del grupo que consiste en proteína, virus inactivado, ADN, antígenos con vector viral, partículas de replicón de alfavirus y partículas semejantes a virus que presentan o expresan TRP2.
14. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y reivindicaciones 5 a 8 cuando depende de la reivindicación 3, que comprende además al menos una etapa posterior de administración de una composición farmacéutica que comprende partículas de replicón de virus de la encefalitis equina venezolana que expresan TRP2.

15. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y reivindicaciones 5 a 8 cuando depende de la reivindicación 3 o la composición inmunogénica o la composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la composición farmacéutica administrada a un sujeto en una dosis es de 10^4 a 10^{10} partículas de replicón de virus; en el que la dosis es, opcionalmente 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 ó 10^{10} partículas de replicón de virus.
- 5

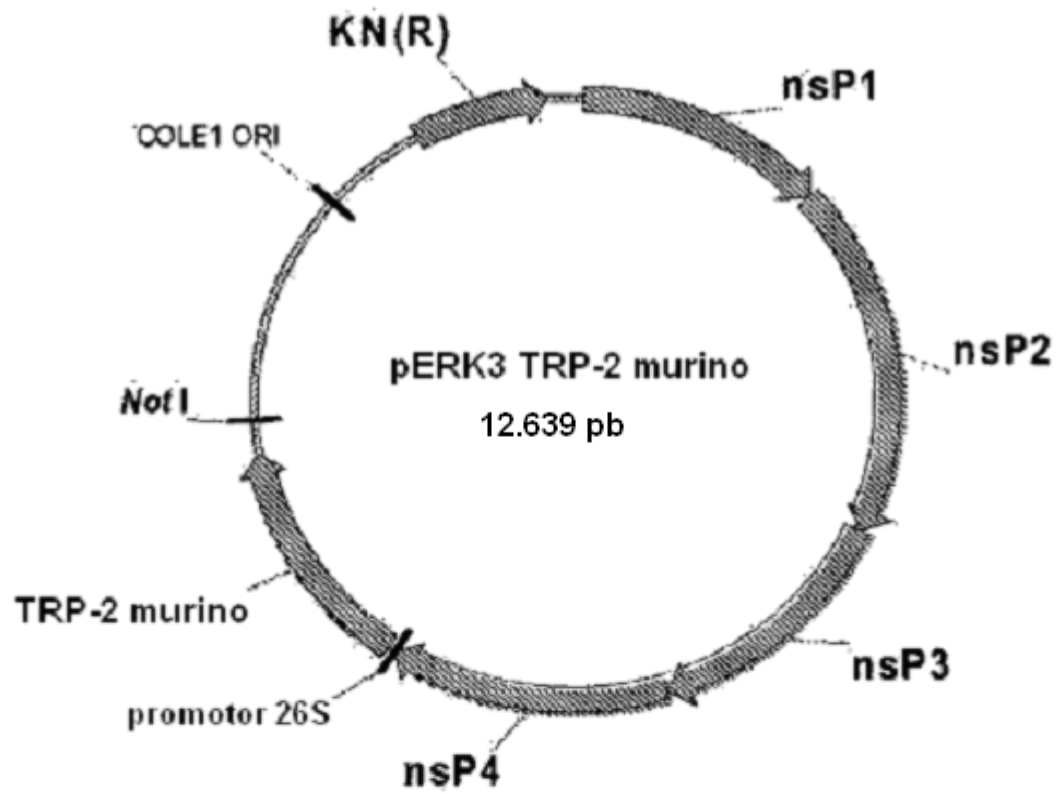


Figura 1A

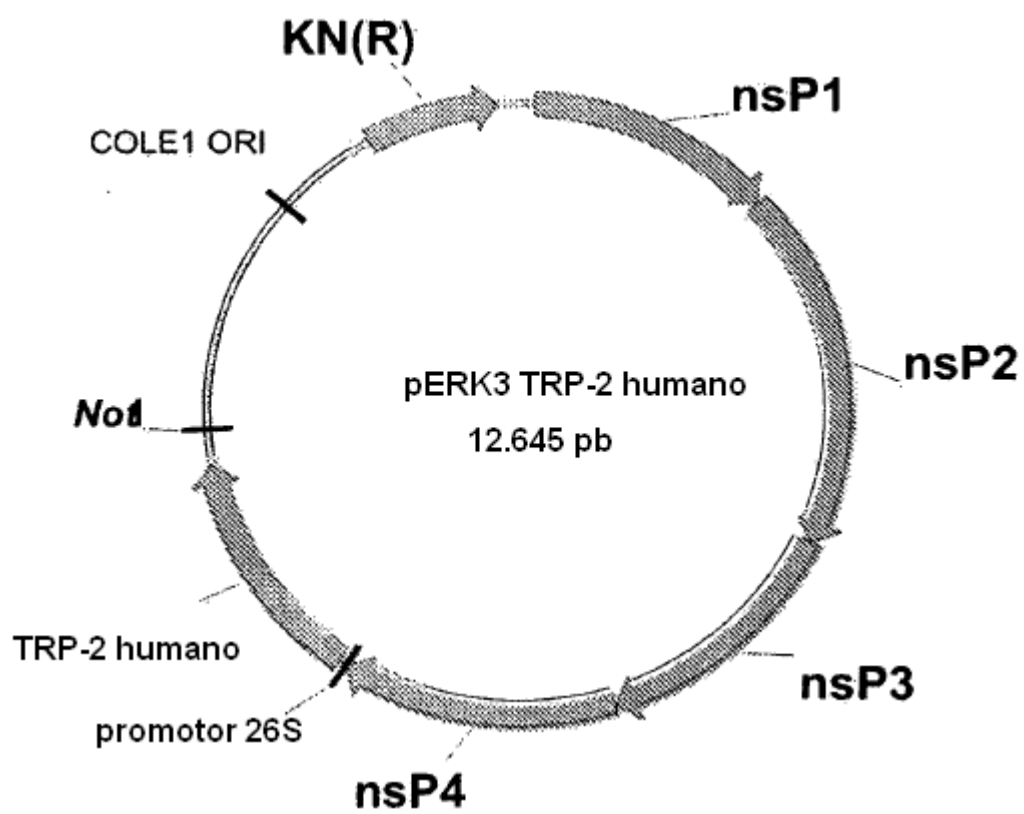


Figura 1B

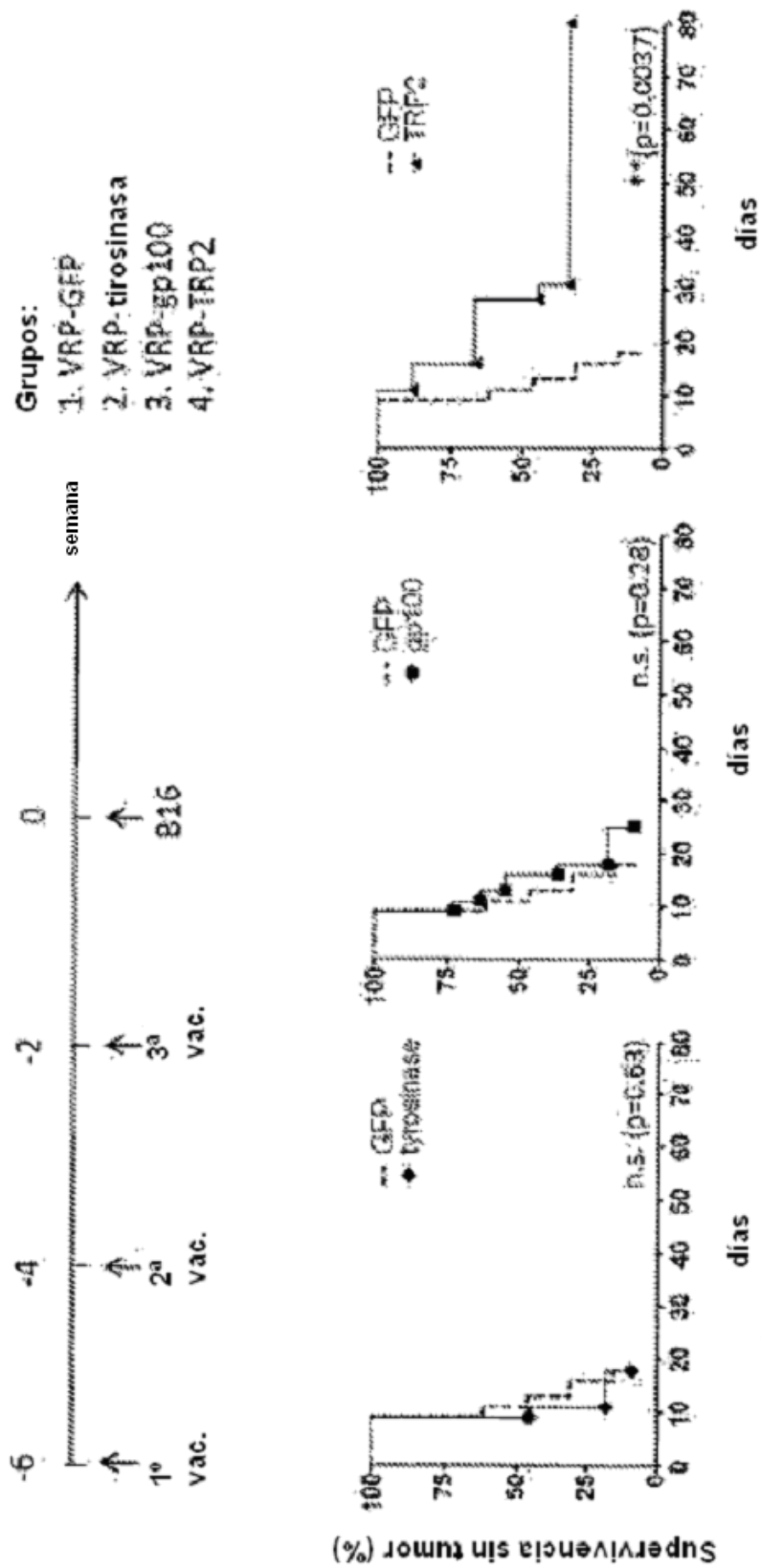


Figura 2

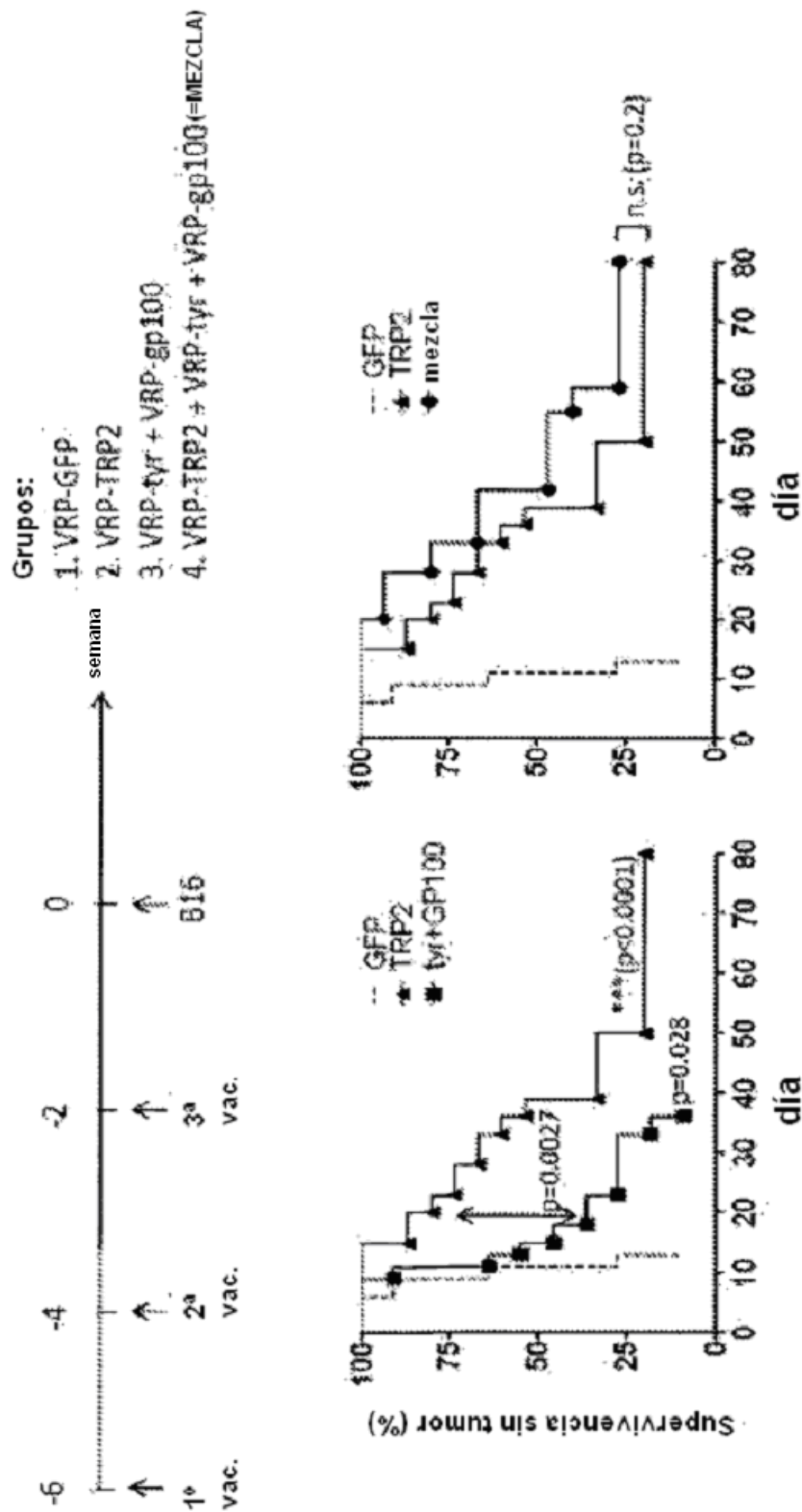


Figura 3

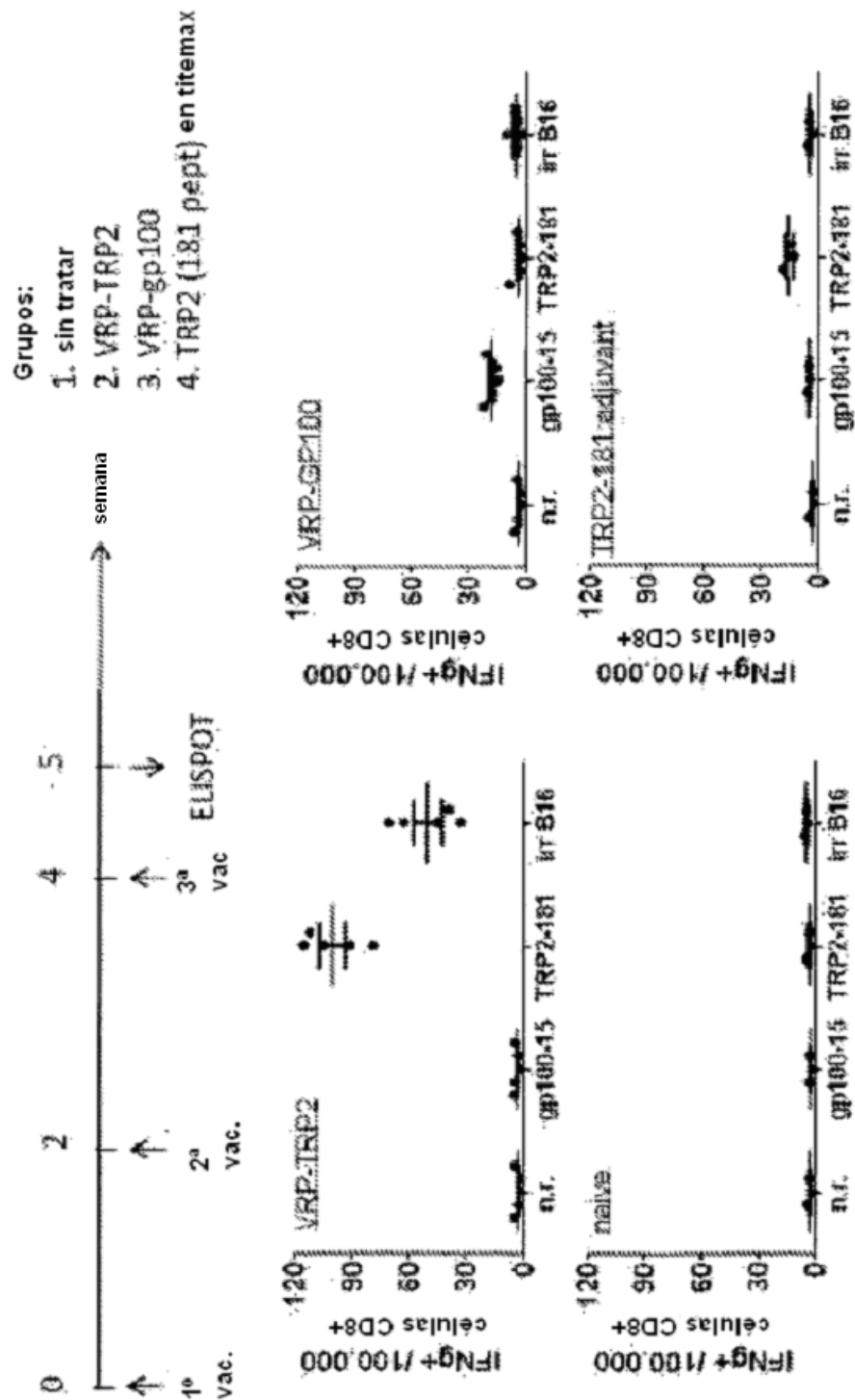


Figura 4

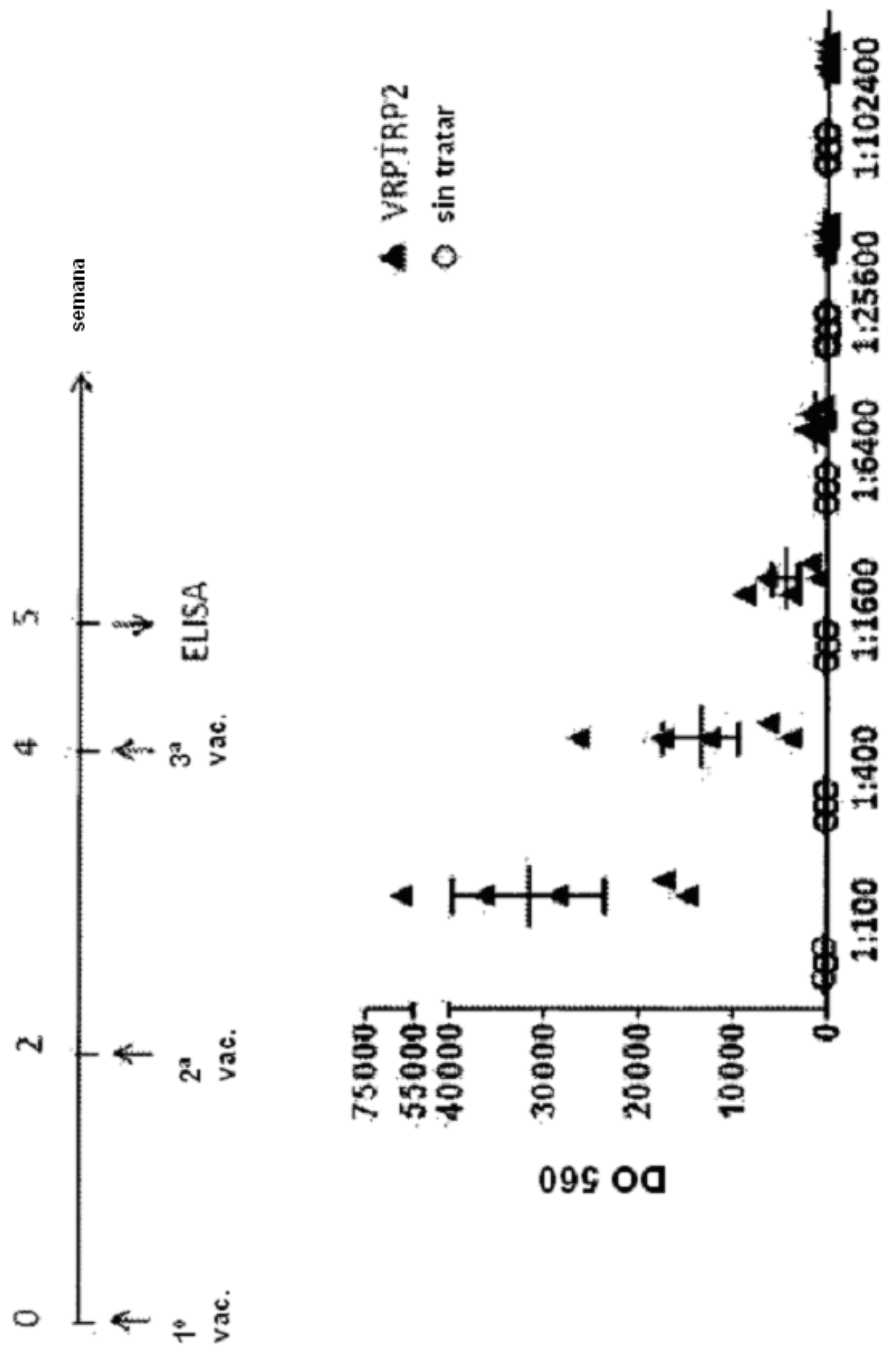


Figura 5

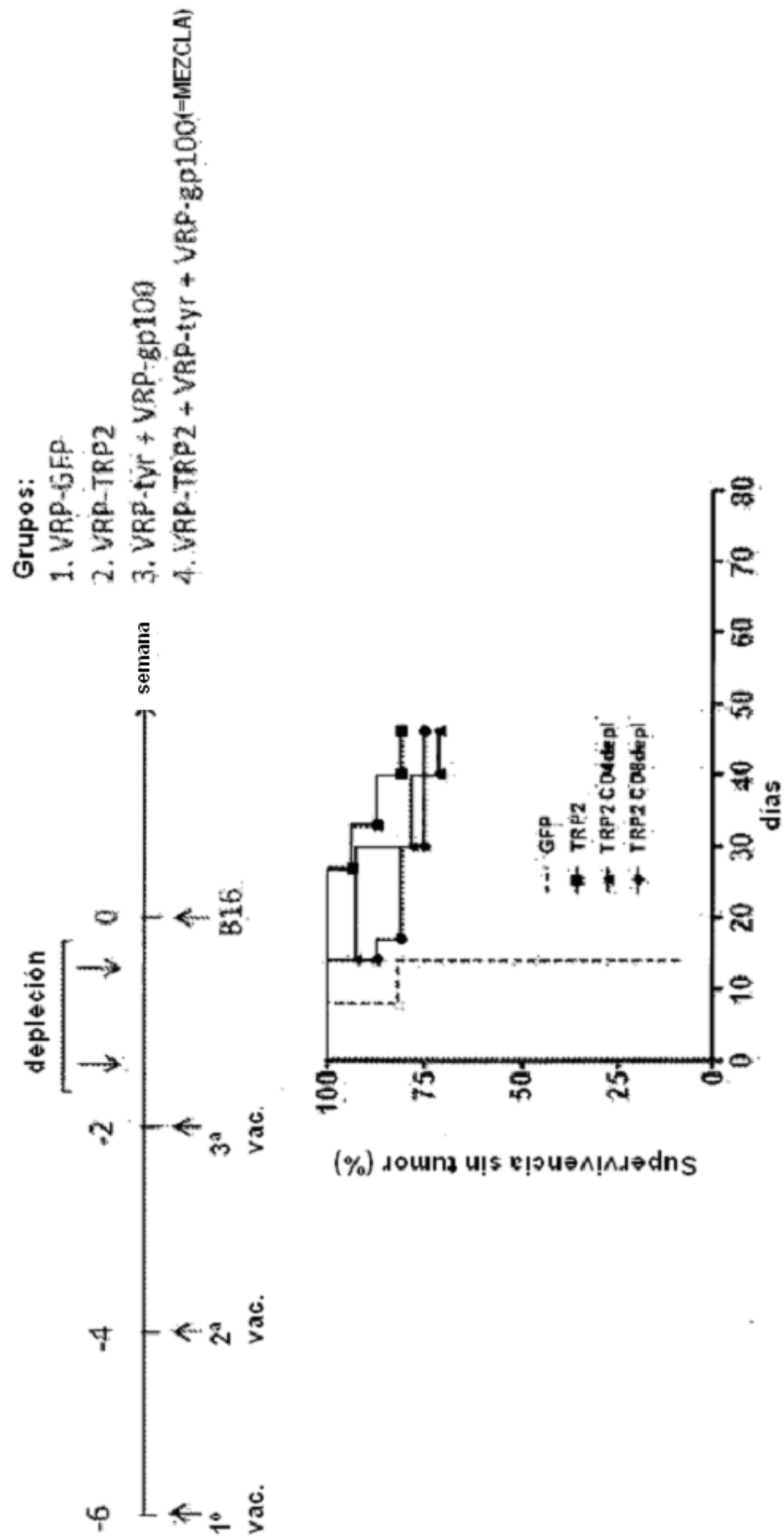
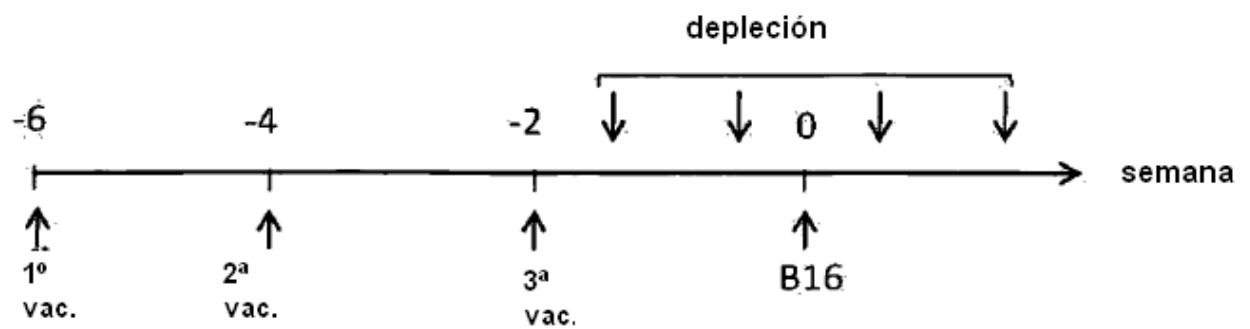


Figura 6A



Grupos:

1. VRP-GFP
2. VRP-TRP2
3. VRP-TRP2 + CD8+CD4 depleción
4. VRP-TRP2 + NK+NKT depleción

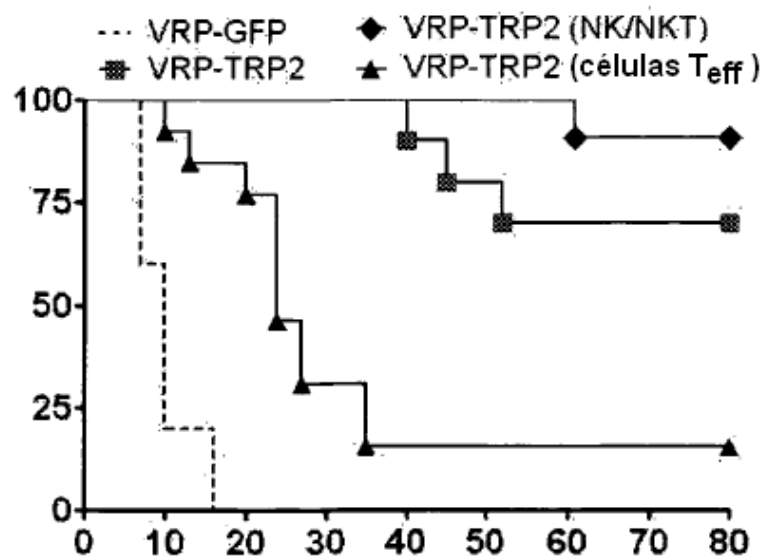
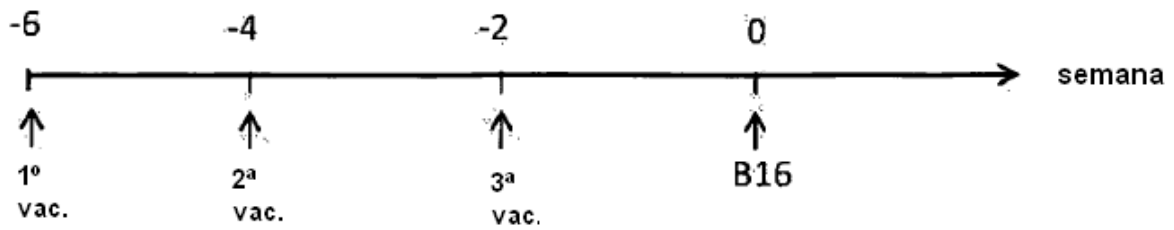


Figura 6B



Grupos:

1. Ratones WT VRP-GFP
2. Ratones WT VRP-TRP2
3. Ratones deficientes MHC I VRP-GFP
4. Ratones deficientes MHC I VRP-TRP2
5. Ratones deficientes MHC II VRP-GFP
6. Ratones deficientes MHC II VRP-TRP2

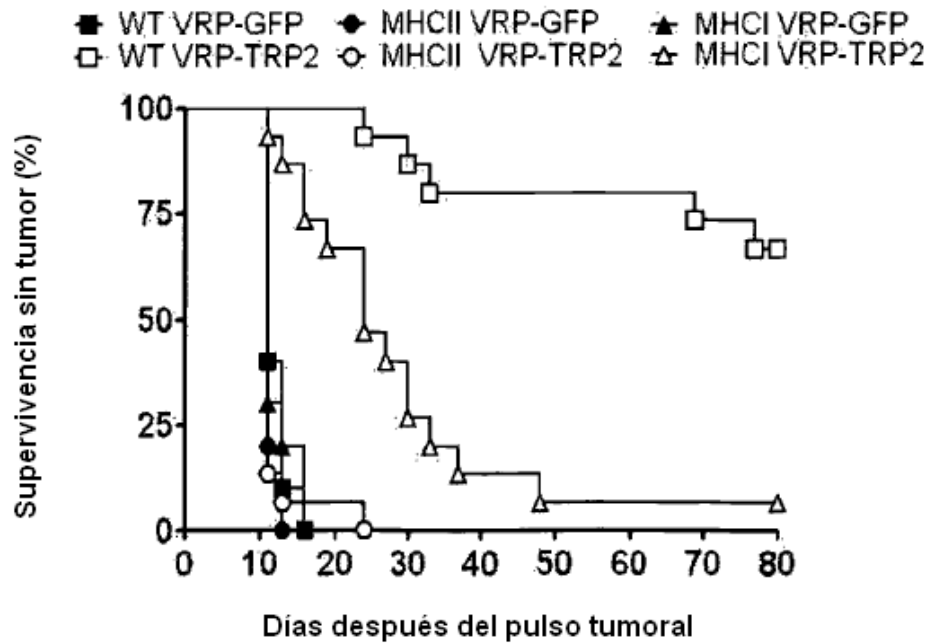
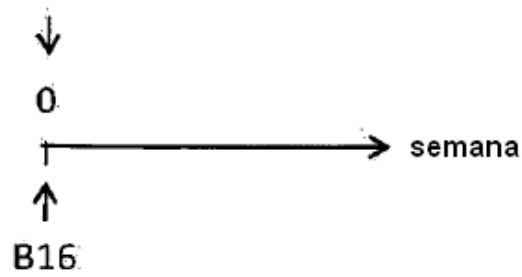


Figura 6C



Grupos:

1. Sueros de ratones inmunizados con VRP-GFP
2. Sueros de ratones inmunizados con VRP-TRP2
3. Sueros de ratones inmunizados con VRP-gp100
4. Sueros de ratones inmunizados con VRP-tyr

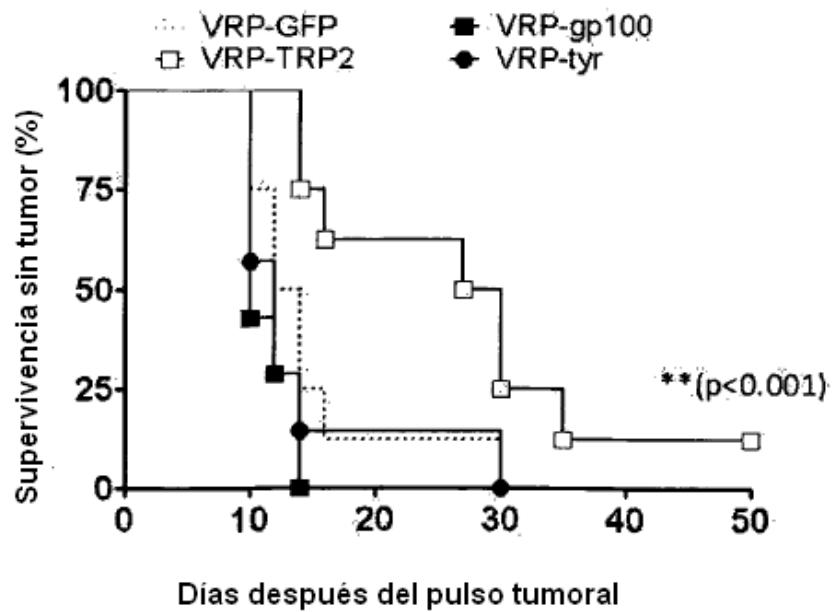
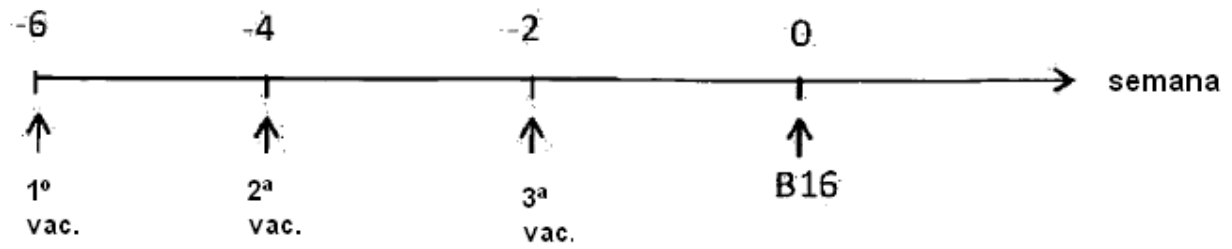


Figura 6D



Grupos:

1. Ratones $Fc\gamma R^{+/-}$ VRP-GFP
2. Ratones $Fc\gamma R^{+/-}$ VRP-TRP2
3. Ratones $Fc\gamma R^{-/-}$ VRP-GFP
4. Ratones $Fc\gamma R^{-/-}$ VRP-TRP2

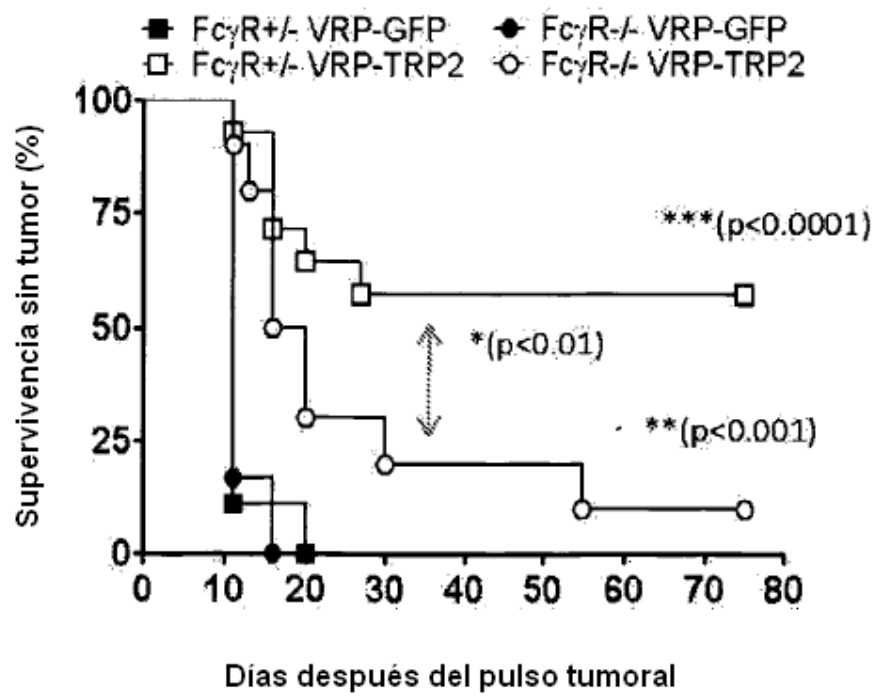


Figura 6E

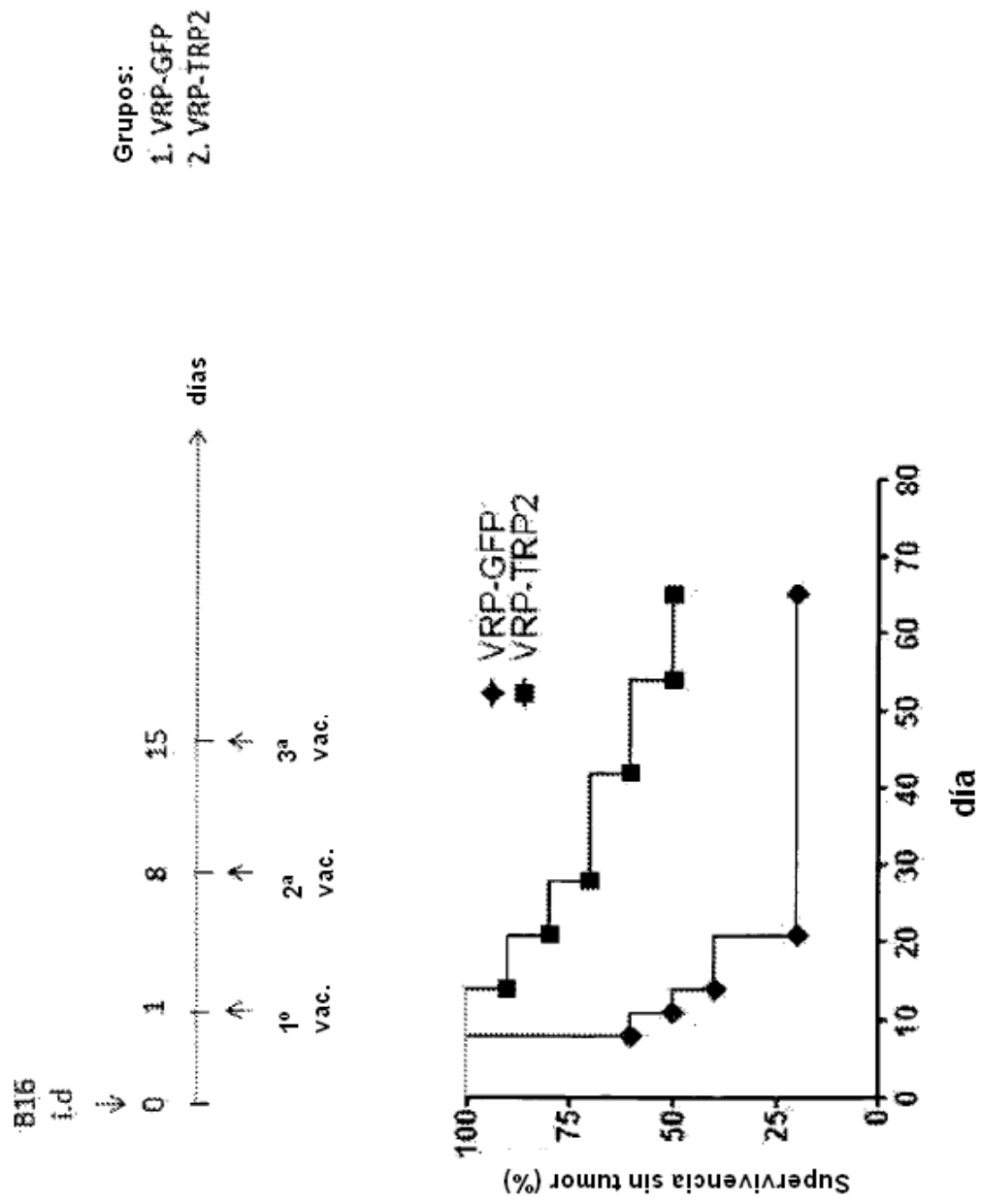


Figura 7

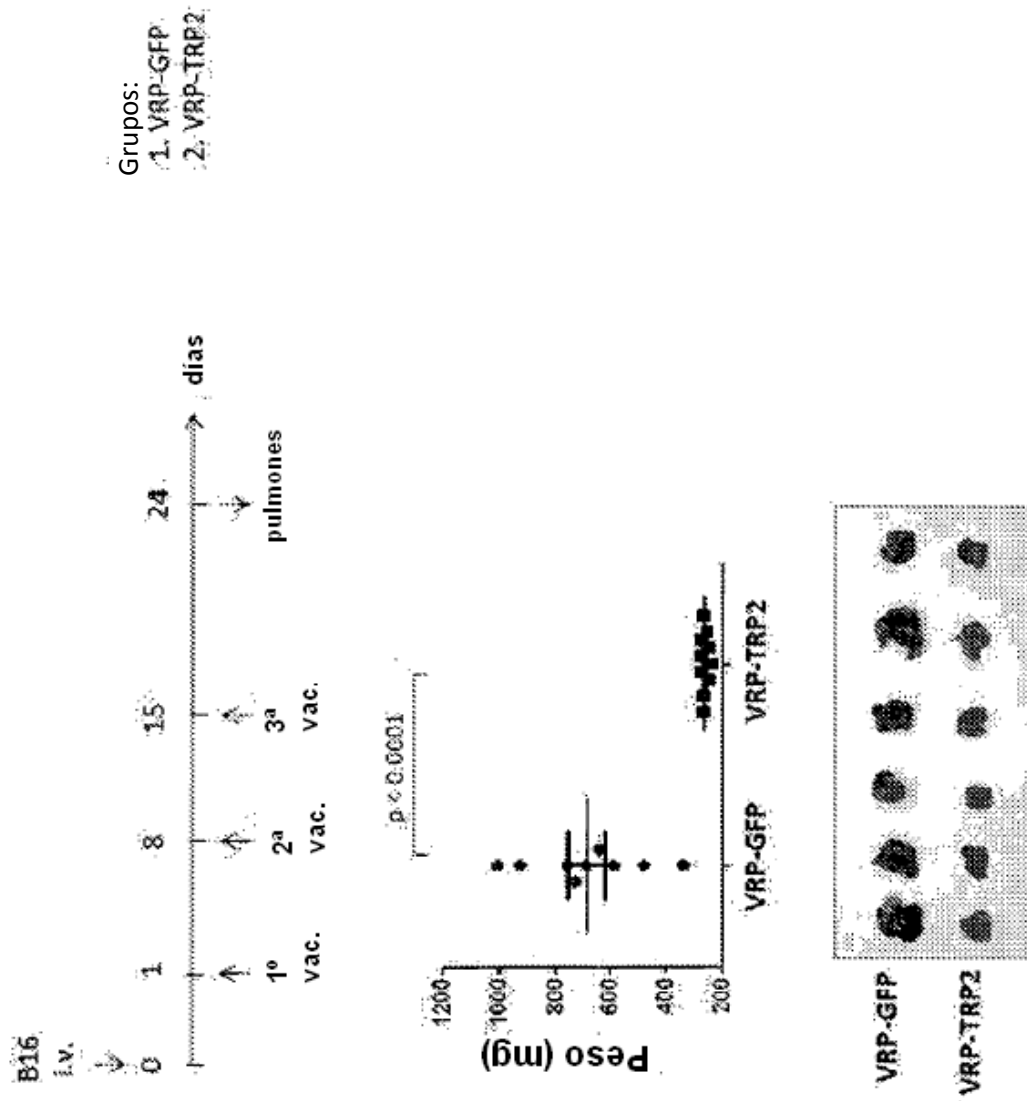


Figura 8

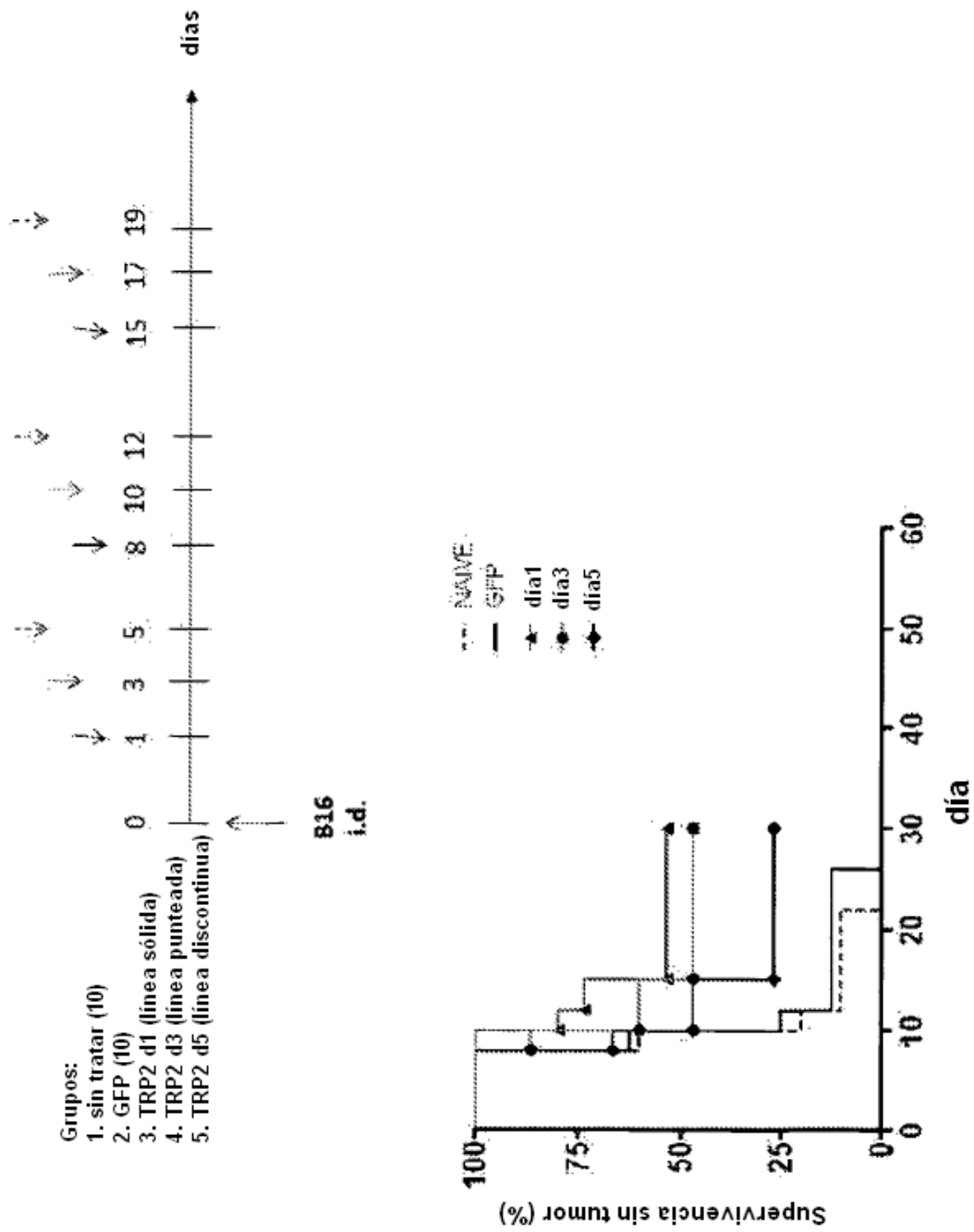


Figura 9

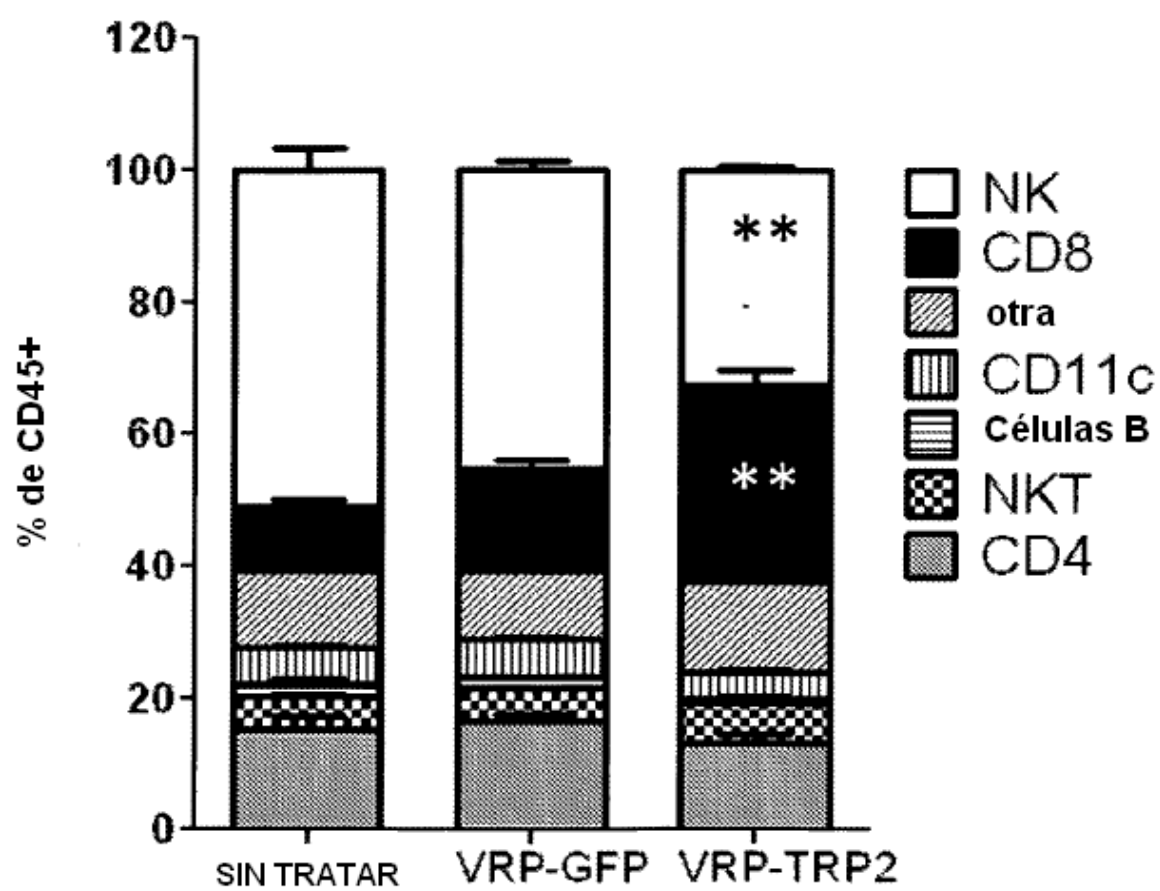


Figura 10