

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 806**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2011 PCT/NL2011/050586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12026820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2011 E 11751668 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2608802**

54 Título: **Método inmunoterapéutico para tratar el cáncer de próstata**

30 Prioridad:

27.08.2010 EP 10174349

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

05.07.2017

73 Titular/es:

**PANTARHEI BIOSCIENCE B.V. (100.0%)
Boslaan 13
3701 CH Zeist, NL**

72 Inventor/es:

COELINGH BENNINK, HERMAN JAN TIJMEN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 621 806 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

Método inmunoterapéutico para tratar el cáncer de próstata

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo del tratamiento de cáncer de próstata y su metástasis. Más específicamente, la invención se refiere a polipéptidos inmunogénicos que comprenden al menos una porción de una (glico)proteína asociada a células de tumor de próstata o sus variantes inmunológicamente activas y a

10 ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos.
Tales polipéptidos y secuencias de ácidos nucleicos se pueden utilizar en vacunas y composiciones farmacéuticas para el tratamiento terapéutico y profiláctico del cáncer de próstata y su metástasis.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El cáncer de próstata es el cuarto cáncer más predominante en hombres.

En Norteamérica y Europa del norte, es con diferencia el cáncer más común en varones y es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres.

20 En Estados Unidos solo, unos 40.000 hombres mueren anualmente por esta enfermedad, después del cáncer de pulmón.

A pesar de la magnitud de estas figuras, sigue sin haber un tratamiento eficaz para el cáncer de próstata metastásico.

25 Una inmensa evidencia clínica muestra que el cáncer de próstata humano es propenso a convertirse en metástasis al hueso, y la enfermedad resulta progresar inevitablemente del estado andrógeno-dependiente al estado andrógeno refractario, conduciendo a una mayor mortalidad de pacientes.

[0003] A pesar de la investigación considerable en terapias para la enfermedad, el cáncer de próstata sigue siendo difícil de tratar.

30 Prostatactomía quirúrgica, terapia de radiación, terapia de ablación hormonal, castración quirúrgica y quimioterapia siguen siendo las modalidades de tratamiento principales.

Desafortunadamente, estos métodos son inefectivos en un porcentaje significativo de casos.

La edad y salud subyacente del hombre, la extensión de la metástasis, la apariencia bajo el microscopio, y la respuesta del cáncer al tratamiento inicial son importantes para determinar los resultados de la enfermedad y el tratamiento potencial.

35 La decisión de tratar o no el cáncer de próstata localizado (un tumor contenido en la próstata) con intento curativo es una compensación del paciente entre los efectos beneficiosos y nocivos previstos en cuanto a supervivencia del paciente y calidad de vida.

[0004] La identificación de objetivos terapéuticos nuevos es esencial para mejorar el tratamiento actual de

40 pacientes con cáncer de próstata.
Los últimos avances en medicina molecular han aumentado el interés en los antígenos específicos de la superficie celular del tumor que podrían servir como objetivos para varias estrategias inmunoterapéuticas o de moléculas pequeñas.

45 [0005] Entre los varios elementos del sistema inmunológico, los linfocitos T son probablemente los más adeptos para reconocer y eliminar células que expresan antígenos extranjeros o asociados al tumor.

Linfocitos T citotóxicos (CTL) expresan el marcador superficial de células CD8 y se especializan en la inducción de lisis de las células diana con las cuales reaccionan por medio de la perforina/granzima y/o las vías Fas/Fas-L.

50 El receptor de células T (TCR) para antígeno de CTL se enlaza a un complejo molecular en la superficie de la célula objetivo formada por residuos de péptidos pequeños (8-11) derivados de antígenos extranjeros procesados o asociados al tumor, que se asocian con moléculas de clase I de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

55 [0006] El otro subconjunto mayor de células T, linfocitos T auxiliares (células auxiliares T o HTL), se caracterizan por la expresión del marcador superficial CD4.

60 Las células auxiliares T reconocen péptidos ligeramente mayores (11-20 residuos), también derivados de antígenos asociados extranjeros o tumorales, pero en el contexto de las moléculas de MHC de clase II, que son expresados solo por células presentadoras de antígenos (APC) especializadas tales como linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC).

[0007] A consecuencia de la estimulación con TCR de CTL ingenuos y HTL por complejos de péptido/MHC en APC, las CTL maduran en células asesinas efectoras capaces de lisar células (tumorales) que expresan el complejo de clase I de péptido/MHC correspondiente.

65 HTL activados amplifican respuestas de CTL haciendo las APC más eficaces en la estimulación de los CTL ingenuos y produciendo linfoquinas que estimulan la maduración y proliferación de CTL.

El efecto potenciador de células T auxiliares ocurre en los órganos linfoides secundarios donde se inicia la respuesta inmune y en el sitio tumoral donde las respuestas de CTL necesitan ser sostenidas hasta que las células tumorales son eliminadas.

Así, se podría predecir que las vacunas deberían estimular los CTL reactivos al tumor y los HTL para generar inmunidad antitumoral eficaz.

[0008] Antígenos adecuados para estrategias para el tratamiento del cáncer inmunoterapéuticas deberían ser altamente expresados en tejidos cancerosos e idealmente no en tejidos adultos normales.

La expresión en tejidos que son innecesarios para la vida, sin embargo, puede ser aceptable.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que antígenos adecuados para estrategias inmunoterapéuticas en el tratamiento del cáncer de próstata y su metástasis se proporcionan por las (glico)proteínas de la zona pelúcida.

Conforme a la invención, los antígenos de ZP3 que son capaces de inducir una respuesta de células T CD8⁺ y/o CD4⁺ al igual que secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos antígenos, pueden idóneamente usarse en una estrategia inmunoterapéutica para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico del cáncer de próstata.

[0010] La presente invención reside en el hallazgo de que las células de tumor de próstata muestran expresión significativa de (glico)proteínas ZP3, hasta tal extensión que estas células son previstas eficazmente por la respuesta inmune suscitada por la administración de (glico)proteínas ZP3 derivadas de antígenos, dando como resultado un crecimiento disminuido o incluso tamaño reducido de tumores prostáticos primarios al igual que de la metástasis que se origina a partir de estos.

La presente estrategia es igualmente apta para prevenir metástasis de un tumor de próstata al igual que para prevenir la recurrencia de tumores de próstata en sujetos tratados.

[0011] ZP3 es normalmente encontrada en la denominada "zona pelúcida" que forma una matriz extracelular que rodea el ovocito en desarrollo y ovulado y el embrión en preimplantación.

Esta zona pelúcida induce la reacción del acrosoma en el esperma, determina la especificidad de especies para fertilización y previene la polispermia en mamíferos.

La zona pelúcida contiene cuatro glicoproteínas mayores, ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4.

[0012] WO02/12330 divulga el tratamiento de cáncer de próstata por proteínas de fusión a toxina o citocina del polipéptido ZP1.

Análisis de PCR y secuenciación parcial ha mostrado que la proteína ZP1 de la Zona pelúcida, llamada Zzp1 en WO02/12330, se expresa en la próstata y otros seis tipos de tejido y podrían por lo tanto servir para, entre otras cosas, el tratamiento de tumores en estos tejidos o para prevenir la metástasis del tumor.

[0013] WO 2007/058536 trata el tratamiento del cáncer ovárico en ratones por inmunización con hZP1, hZP2, hZP3 o hZP4.

En los ejemplos rhZP2 fue usado.

[0014] La expresión de (glico)proteína ZP3 en las células (derivadas) de tumores de próstata nunca ha sido establecida antes.

Así no hay ninguna indicación en el estado de la técnica de que las células de tumor prostático puedan de hecho volverse el objetivo de una respuesta inmune celular suscitada por la administración de antígenos (derivados) de ZP3.

[0015] La presente invención por lo tanto proporciona por primera vez un método para tratar los tumores de próstata en un humano que comprende inmunizar dicho humano con una fuente de un polipéptido que comprende un epítipo de células T de zona pelúcida nativo restringido a MHC de clase I o MHC de clase II o una de sus variantes inmunológicamente activas, al igual que a composiciones adecuadas para usar en tales métodos.

[0016] La presente invención se describe con más detalle de aquí en adelante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0017] Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una fuente de un polipéptido, dicho polipéptido comprendiendo un epítipo de células T de zona pelúcida 3 humano restringido a MHC de clase I y/o MHC de clase II que es capaz de suscitar una respuesta inmune mediada por células T *in vivo* o una de sus variantes inmunológicamente activas, para usar en métodos de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de cáncer de próstata y/o su metástasis en un humano.

En una forma de realización particularmente preferida de la invención, dicho método es un método para tratamiento terapéutico.

- 5 [0018] La denominación de los componentes de glicoproteína ZP ha sido más bien inconsistente durante estos últimos años, utilizando diferentes criterios, incluyendo peso molecular aparente, longitud de secuencia de proteínas y comparación de identidad de secuencias, que ha resultado en una nomenclatura confundida. Harris et al. [(1994) DNA seq. 96:829-834] propusieron un sistema constante de nomenclatura donde genes ZP fueron nombrados en orden de longitud de su secuencia de proteína codificada desde la más larga a la más corta.
- 10 Ya que, bajo aquellos criterios, los genes ZP de ratón cayeron en el orden ZP2, luego ZP1 y luego ZP3, un sistema nuevo fue introducido donde ZP2 se volvió ZPA, ZP1, se volvió ZPB y ZP3 se volvió ZPC. Más recientemente Hughes et al [(1999) BBA-Gene Structure and Expression 1447:303-306], entre otros, informaron que el ortólogo humano real del gen ZP1 conocido de ratón no es ZPB, sino que hay un gen ZP1 humano diferente.
- 15 Está ahora aceptado generalmente que hay cuatro familias de glicoproteína ZP (humanas) diferentes ZP1, ZP2, ZP3 y ZPB [cf. Lefievre et al (2004) Hum. Reprod. 19:1580-1586]. La glicoproteína ZPB según esta nomenclatura es ahora también referida como ZP4. Esta nomenclatura es por ejemplo aplicada en las bases de datos Uniprot/SWISSprot, ensEMBL, BLAST (NCBI), SOURCE, SMART, STRING, PSORT2, CDART, UniGene y SOSUI, todas implementadas en el Bioinformatic Harvester (<http://harvester.embl.de>).
- 20 [0019] Según esto, los términos ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 son empleados aquí para indicar las cuatro familias de glicoproteína ZP, donde ZP2, ZP3 y ZP4 corresponden a ZPA, ZPC y ZPB respectivamente según la nomenclatura propuesta por Harris et al.
- 25 De forma más particular, los términos hZP1, hZP2, hZP3 y hZP4 como se utilizan en este caso se refieren a las (glico)proteínas que tienen esqueletos de polipéptidos de protocolos de secuencias SEQ ID n° 1, SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 3 y SEQ ID n° 4 respectivamente y sus variantes alélicas.
- 30 [0020] Por lo tanto, variantes alélicas de las secuencias ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 que pueden ocurrir en el humano están comprendidas también por los términos respectivos (h)ZP1, (h)ZP2, (h)ZP3 y (h)ZP4. Variantes alélicas incluyen en particular variantes resultantes de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP). SNP pueden caer dentro de las secuencias codificantes de genes, regiones no codificantes de genes, o en las regiones intergénicas entre genes. SNP dentro de una secuencia codificante no necesariamente cambiarán la secuencia de aminoácidos de la proteína que es producida.
- 35 Un SNP donde ambas formas llevan a la misma secuencia polipeptídica es denominado sinónimo (llamado a veces una mutación silenciosa) - si una secuencia polipeptídica diferente es producida se denomina no sinónimo. Para una variante para ser considerada un SNP, debe ocurrir en al menos el 1% de la población.
- 40 En el contexto de la presente invención "variantes alélicas" también puede incluir variantes de secuencias polipeptídicas resultante de mutaciones (no sinónimas), es decir variantes polipeptídicas resultantes de mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, etc. que ocurren en menos del 1% de la población.
- 45 [0021] Así, conforme a la presente invención los términos (h)ZP1, (h)ZP2, (h)ZP3 y (h)ZP4 incluyen (glico)proteínas ZP que difieren de SEQ ID n° 1, SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 3 y SEQ ID n° 4 respectivamente por modificaciones de secuencia menores. Tales modificaciones incluyen, pero de forma no limitativa: cambios en uno o unos pocos aminoácidos, incluyendo deleciones (por ejemplo, una versión truncada del péptido) inserciones y/o sustituciones. Típicamente, cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando parámetros por defecto una variante alélica comparte al menos un porcentaje determinado de identidad de secuencia con secuencias a las que se hace referencia arriba.
- 50 GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias sobre su longitud entera, maximizando el número de coincidencias y minimiza el número de espacios. Generalmente, los parámetros por defecto de GAP se usan, con una penalización por creación de espacio = 8 y penalización por extensión de espacio = 2.
- 55 Para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89,915-919). Alineaciones de secuencia y puntuaciones para porcentaje de identidad de secuencias se pueden determinar utilizando programas informáticos, tal como el GCG Wisconsin Package, versión 10.3, disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, USA.
- 60 El porcentaje de similitud o identidad alternativamente se puede determinar por la búsqueda en las bases de datos tal como FASTA, BLAST, etc. Una "variante alélica" se entiende aquí que tiene al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, todavía más preferiblemente al menos 98%, todavía más preferiblemente al menos 99%, todavía más preferiblemente al menos 99,5 % y de la forma más preferible al menos 99,9 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de SEQ ID n° 1, SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 3 y SEQ ID n° 4.
- 65

[0022] En este documento y en sus reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los artículos después de la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no están excluidos.

5 Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" no excluye la posibilidad de que más de uno del elemento esté presente, a menos que el contexto requiere claramente que haya uno y solo uno de los elementos.
El artículo indefinido "un" así normalmente significa "al menos un".

10 [0023] El término "cáncer de próstata", como se utiliza en este caso, se refiere tanto a tumores de próstata primarios como a metástasis de dichos tumores de próstata primarios que pueden estar establecidos en cualquier sitio del cuerpo.

15 [0024] Típicamente, para los fines de la presente invención, el término "cáncer de próstata" o "tumor de próstata" es sinónimo de "enfermedad neoplásica de próstata" o "neoplasma de próstata".
Estos términos son considerados totalmente intercambiables, aunque cabe señalar que para enfermedades de ciertos tejidos además de la próstata, los términos "neoplasma" y "tumor" se puede considerar que no coinciden totalmente.
Conforme a la presente invención el término "cáncer de próstata" típicamente no incluye condiciones preneoplásicas, tales como hiperplasia, metaplasia, displasia o similar.

[0025] Un aspecto importante de la presente invención es el descubrimiento de la expresión de (glico)proteína ZP3 en la célula (tumoral) prostática que permite suscitar una respuesta inmune contra dichas células.

25 No obstante, como tumores diferentes pueden tener patrones diferentes o alterados de expresión génica, determinados tumores prostáticos que no expresan (glico)proteínas ZP3 en cualquier extensión significativa pueden ocurrir también, como se entenderá por la persona experta.
Por lo tanto, típicamente, la invención concierne el tratamiento de cáncer de próstata o su metástasis, que expresa ZP3.

30 [0026] El método según la invención puede constituir el tratamiento primario o ser aplicado como terapia adjuntiva durante o después del tratamiento de pacientes que utilizan cualquiera de los métodos convencionales, incluyendo por ejemplo cirugía, criocirugía, terapia de radiación, incluyendo braquiterapia y radiación de rayo externo, ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU), terapia hormonal o quimioterapia, o alguna de sus combinaciones.
35 Es sin embargo de conocimiento común que muchos de los tratamientos anti-cáncer convencionales, especialmente quimioterapia y radiación pueden ser altamente inmunosupresores.
Será claro para la persona experta que la eficacia del presente método puede ser inferior cuando se siguen tales tratamientos.

40 [0027] Conforme a la invención, los métodos son adecuadamente empleados para el tratamiento de cáncer de próstata primaria y su metástasis, que se considera aquí que constituyen un "tratamiento terapéutico" o "tratamiento curativo", al igual que para prevenir la metástasis y/o recurrencia de cáncer de próstata opcionalmente después o en combinación con otros métodos de tratamiento, tal como se ha descrito antes, que se considera aquí que constituye el "tratamiento profiláctico".
45 En una forma de realización particularmente preferida de la invención el método según la invención se aplica en combinación con cirugía, terapia hormonal y/o tratamiento con un agente seleccionado de docetaxel, bevacizumab, talidoma, cabazitaxel, abiraterona, temozolomida.

50 [0028] El sujeto que se debe tratar es preferiblemente un varón humano.

[0029] Conforme a la presente invención, la "fuente de un polipéptido" que se administra al humano según el presente método, puede ser o comprender una proteína o glicoproteína, una digestión de la proteína o glicoproteína y/o sus fragmentos, que pueden estar en una forma purificada o comprendidos dentro de una composición cruda, preferiblemente de origen biológico, tales como lisados, sonicados o fijados de líneas celulares eucariotas o procariotas.

55 Alternativamente, dicha fuente de un polipéptido puede ser o comprender (poli)péptidos sintetizados químicamente o (poli)péptidos que han sido producidos *in vitro* enzimáticamente, que pueden estar en una forma purificada o pueden estar comprendidos dentro de una composición cruda.

60 La fuente del polipéptido también puede ser o comprender un ácido nucleico que codifica el polipéptido, a partir de un molde de ARN o de ADN.

Las moléculas de ARN o de ADN pueden ser ADN "desnudo", preferiblemente comprendidas en vesículas o liposomas, o pueden estar comprendidas en un vector.

65 El vector puede ser cualquier vector de ADN (recombinante) o de ARN conocido en la técnica, y es preferiblemente un plásmido donde los genes que codifican antígenos de latencia están operativamente enlazados a secuencias reguladoras que confieren expresión y traducción de los mensajeros codificados.

- El vector también puede ser cualquier virus de ADN o ARN, tal como pero no limitado a Adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), un retrovirus, un lentivirus, virus modificado de Vaccinia Ankara (MVA) o virus de viruela aviar, o cualquier otro vector vírico capaz de conferir expresión de polipéptidos que comprenden epítomos de latencia a un huésped.
- 5 Vectores de ADN pueden ser no integrantes, tales como vectores de replicación de forma episomal o pueden ser vectores que se integran en el genoma huésped por integración aleatoria o por recombinación homóloga. Un ejemplo de la construcción de plásmidos que incorporan ADNc de ZP2 humano, plásmidos que podrían adecuadamente ser usados conforme a la presente invención se pueden encontrar en una publicación por Martinez et al. [(1996) Journal of Reproduction and Fertility Supplement 50:35-41].
- 10 [0030] Moléculas de ADN que comprenden genes que codifican los polipéptidos según esta invención, opcionalmente introducidas en vectores tales como virus o plásmidos, se pueden integrar en un genoma de un huésped.
- En una forma de realización preferida de la invención, tal huésped puede ser un microorganismo.
- 15 Preferiblemente tal microorganismo recombinante es un *Mycobacterium*, por ejemplo las especies *M. Tuberculosis* o *M. Bovis* y de la forma más preferible *M. bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG), capaz de entregar a un huésped los polipéptidos o sus fragmentos según la invención. BCG recombinante y métodos para la recombinación son conocidos en la técnica, por ejemplo en WO2004094469.
- 20 Tal microorganismo recombinante se puede formular como una vacuna recombinante viva y/o atenuada viva, como por ejemplo en Jacobs et al. 1987, Nature, 327(6122):532-5). El vector también se puede comprender en un huésped de origen bacteriano, tal como pero no limitado a bacterias de Shigella o Salmonella atenuadas vivas y/o recombinantes.
- 25 [0031] El término "epítomo" como se utiliza en este caso se refiere a una porción de un antígeno, definido típicamente por un péptido, que es capaz de suscitar una respuesta celular o humoral inmunitaria cuando se presenta en un contexto *in vivo* relevante fisiológicamente.
- Un "epítomo de células T" se refiere a un péptido o porción del mismo que se enlaza a una molécula de MHC y se reconoce por células T cuando se presentan en moléculas de MHC.
- 30 Un epítomo de células T es capaz de inducir una respuesta inmune mediada por células vía presentación directa o indirecta en las moléculas de MHC de membrana heterodimérica. En resumen, las moléculas de MHC preferentemente enlazan residuos de aminoácidos particulares conocidas como residuos de "anclaje" (K. Falk et al., Nature 351:290-96 (1991)). Esta caracterización permite identificar epítomos de reconocimiento de MHC de clase I y II dentro de cualquier
- 35 secuencia peptídica conocida. En el presente contexto, el término "epítomo restringido de MHC" es sinónimo de epítomo de células T. El término "epítomo restringido de MHC de clase I", como se utiliza en este caso, se refiere a secuencias de péptidos reconocidas por linfocitos T citotóxicos (llamados también células CD8⁺ o CTL) en asociación con MHC de clase I.
- 40 El término "epítomo restringido de MHC de clase II", como se utiliza en este caso, se refiere a un péptido reconocido por células T auxiliares (también llamadas células CD4⁺ o HTL). Un "epítomo de células B" es una porción de un antígeno, típicamente un péptido, capaz de unirse a un sitio de unión de antígeno de una inmunoglobulina y por lo tanto capaz de estimular una respuesta humoral sin presentación en una molécula de MHC.
- 45 Como se ha explicado aquí anteriormente el polipéptido útil en la presente invención, o el ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, comprende al menos un epítomo de células T. El uso de polipéptidos que también comprenden un epítomo de células B sin embargo no está excluido de la presente invención.
- 50 Los presentes polipéptidos inmunogénicos también pueden incluir epítomos de células T múltiples y, opcionalmente un epítomo de células B. Cuando epítomos múltiples están presentes en un péptido, los epítomos se pueden orientar en serie o en una configuración anidada o superpuesta donde al menos un residuo de aminoácido se puede compartir por dos o más epítomos.
- 55 [0032] El polipéptido de la invención incluye preferiblemente uno o más epítomos de unión de clase I de MHC. Como se conoce generalmente por la persona experta, un antígeno que comprende un epítomo de péptido único será útil solo para tratar un subconjunto (pequeño) de pacientes que expresan el producto de alelo de MHC que es capaz de unir este péptido específico.
- 60 Se ha calculado que, en seres humanos, las vacunas que contienen epítomos de CTL restringidos por HLA-A1, -A2, -A3, -A24 y -B7 ofrecerían cobertura para aproximadamente el 80 % de individuos de antecedentes más étnicos. Por lo tanto, si el presente método se utiliza para tratar un varón humano, es particularmente preferido que la presente fuente de un polipéptido comprenda una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos diferentes que comprende uno, más preferiblemente dos, de la forma más preferible tres epítomos de hZP3 de unión de
- 65 clase I de MHC seleccionados de epítomos restringidos de HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24 y HLA-B7; o

sus homólogos o una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más polipéptidos o sus homólogos.

[0033] Según otra forma de realización el polipéptido de la invención incluye preferiblemente uno o más epítomos de unión de MHC de clase II.

Los productos de alelos de MHC de clase II más frecuentemente encontrados en seres humanos incluyen HLA-DR1, -DR3, -DR4 y -DR7.

Por consiguiente, se prefiere que la presente fuente de un polipéptido comprenda una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos diferentes, dicho uno o más polipéptidos diferentes que comprenden uno, más preferiblemente dos y de la forma más preferible tres epítomos de hZP3 nativos que unen MHC de clase II seleccionados de epítomos restringidos de HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4 y HLA-DR7; o sus homólogos o una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican dicho uno o más polipéptidos o sus homólogos.

[0034] En todavía otra forma de realización, la presente fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos, dicho uno o más polipéptidos que comprenden uno o más epítomos de unión de clase I de MHC y uno o más epítomos de unión de MHC de clase II, como se describe aquí arriba; sus homólogos o una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos o sus homólogos.

Aún, más preferiblemente dicha fuente comprende una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos diferentes que juntos incluyen esencialmente todos los epítomos de MHC de clase I y de MHC de clase II comprendidos en glicoproteínas hZP3 nativas; u homólogos de dicho uno o más polipéptidos o una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifica dichos polipéptidos o sus homólogos.

[0035] En una forma de realización, la presente fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos inmunogénicos diferentes, que uno o más polipéptidos diferentes juntos comprenden al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, todavía más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90 % y de la forma más preferible al menos 95 % de epítomos de unión restringidos de MHC de clase I y de MHC de clase II comprendidos en glicoproteína hZP3 nativa; u homólogos de dicho uno o más polipéptidos o una o más secuencias de ácidos nucleicos que los codifican.

[0036] En una forma de realización preferida la presente fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de un polipéptido inmunogénico, polipéptido que comprende al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, todavía más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90 % y de la forma más preferible al menos 95 % del esqueleto de aminoácido completo de hZP3 o un homólogo de dicho polipéptido o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido o su homólogo.

[0037] En otra forma de realización particularmente preferida, la fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de una pluralidad de diferentes fragmentos de polipéptidos superpuestos de hZP3, dichos fragmentos de polipéptidos superpuestos diferentes tienen entre 18-60 aminoácidos de longitud, preferiblemente 18-45 aminoácidos, y juntos comprenden al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, todavía más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90 % y de la forma más preferible al menos 95 % del esqueleto de aminoácido completo de dichas glicoproteínas de hZP3; homólogos de dichos polipéptidos o una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos o sus homólogos.

Típicamente, el recubrimiento de aminoácido entre los diferentes fragmentos de polipéptido de 16-80 aminoácidos consecutivos es al menos 7 aminoácidos, preferiblemente al menos 8, más preferiblemente al menos 9 y de la forma más preferible al menos 10 aminoácidos.

[0038] Los motivos de unión a MHC para los alelos de MHC de clase I y clase II más comunes se han descrito.

Estos motivos especifican los residuos de aminoácidos que sirven como anclas de unión de MHC para alelos de MHC de clase I y clase II específicos.

Algoritmos basados en ordenador sofisticados que tienen en cuenta las anclas de unión de MHC al igual que la secuencia de aminoácidos de un péptido se utilizan para predecir y cuantificar la afinidad de unión de la interacción de péptido/MHC.

Así, a partir de la entrada de la secuencia de aminoácidos conocida de (glico)proteínas de zona pelúcida, estos algoritmos hacen una lista de todos los epítomos de células T potenciales, cada uno con su puntuación de unión predictiva correspondiente.

Herramientas de bioinformática comúnmente conocidas para estos fines incluyen HLA_BIND, SYFPEITHI, NetMHC y TEPITOPE 2000 [ver referencias 1-6].

Alternativamente, el experto en la materia será capaz de determinar epítomos de unión de HTL y CTL experimentalmente utilizando experimentación estándar (Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience 2004).

[0039] En algunos casos se ha observado que el mismo péptido se puede enlazar con diferentes productos de alelos de MHC I o II.

En una forma de realización, el uso de tales péptidos de unión de MHC "promiscuos" en el presente método es particularmente preferido.

5 [0040] En una forma de realización, la presente invención proporciona una fuente de un polipéptido para usar en un método para la inducción de una respuesta inmune primaria a glicoproteínas de zona pelúcida nativa en un varón humano, donde el método comprende la etapa de administrar al humano una fuente de un polipéptido, dicho polipéptido comprendiendo un epítipo de células T de hZP3 restringido de MHC de clase I y/o MHC de clase II o una de sus variantes inmunológicamente activas, donde dicha fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de un polipéptido inmunogénico seleccionado de (glico)proteínas hZP3, sus
10 homólogos, y fragmentos inmunológicamente activos de dichas (glico)proteínas y sus homólogos; o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido inmunogénico.

[0041] Según una forma de realización particularmente preferida, la fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de un polipéptido inmunogénico seleccionado de (glico)proteínas hZP3, su homólogo y
15 fragmentos activos inmunológicamente de estas (glico)proteínas y sus homólogos, o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido inmunogénico.

[0042] El término "sus fragmentos inmunológicamente activos " será generalmente entendido en la técnica para referirse a un fragmento de un antígeno de polipéptido que comprende al menos un epítipo, que
20 significa que el fragmento al menos comprende 4, 5, 6,7 o 8 aminoácidos contiguos desde la secuencia del antígeno de polipéptido.

Según la presente invención el fragmento comprende al menos un epítipo de células T. Así un "fragmento inmunológicamente activo " según esta invención comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 aminoácidos contiguos desde la secuencia del antígeno u homólogo de (glico)proteína hZP3 o derivado
25 análogo.

Todavía más preferiblemente el fragmento comprende tanto un CTL como un epítipo auxiliar T. De la forma más preferible, sin embargo, el fragmento es un péptido que requiere tratamiento por una célula presentadora de antígenos, es decir el fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 18 aminoácidos, estos 18 aminoácidos no son necesariamente una secuencia contigua del antígeno de
30 polipéptidos.

[0043] El término "sus homólogos", como se utiliza en este caso se refiere a polipéptidos que difieren del polipéptido de origen natural por modificaciones menores, pero que mantienen el polipéptido básico y estructura de cadena lateral de la forma de origen natural.

35 Tales cambios incluyen, pero de forma no limitativa: cambios en una o unas pocas cadenas laterales de aminoácidos; cambios en uno o unos pocos aminoácidos, incluyendo deleciones (por ejemplo, una versión truncada del péptido) inserciones y/o sustituciones; cambios en la estereoquímica de uno o unos pocos átomos; aminoácidos N- o C- terminales adicionales; y/o derivaciones menores, incluyendo pero no limitado a: metilación, glicosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación, amidación y/o
40 adición de glicosilfosfatidil inositol.

Como se utiliza en este caso, un homólogo o análogo tiene funcionalidad mejorada o sustancialmente similar como el polipéptido de origen natural.

[0044] Un homólogo aquí se entiende que comprende un polipéptido inmunogénico teniendo al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, todavía más preferiblemente al menos 95%, todavía más preferiblemente al menos 98 % y de la forma más preferible al menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con los polipéptidos ZP3 de origen natural de la invención, cuando se alinean óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT que usan parámetros por defecto, y siguen siendo capaces de suscitar al menos la respuesta inmune obtenible así.

50 Generalmente, los parámetros por defecto de GAP se usan, con una penalización por creación de espacio = 8 y penalización por extensión de espacio = 2.

Para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89,915-919).

Alineaciones de secuencia y puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencias se pueden determinar utilizando programas informáticos, tal como el GCG Wisconsin Package, versión 10.3, Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, EE.UU.

55 Alternativamente el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar por la búsqueda contra las bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc.

[0045] Según una forma de realización de la invención, los presentes polipéptidos inmunogénicos tal y como se define aquí antes, son glicosilados.

Sin deseo de estar ligados por la teoría se supone que por la glicosilación de estos polipéptidos su inmunogenicidad es aumentada.

60 Por lo tanto, según una forma de realización preferida, el polipéptido inmunogénico anteriormente mencionado tal y como se define aquí antes, es glicosilado, con un contenido de carbohidrato variable de 10-80 % en peso, basado en el peso total de la glicoproteína o polipéptido glicosilado.

Más preferiblemente dicho contenido de carbohidrato varía de 15-70 % en peso, todavía más preferiblemente de 20-60 % en peso.

En otra forma de realización, dicho polipéptido inmunogénico glicosilado comprende un modelo de glicosilación que es similar al de hZP3 (o su fragmento).

5 Se supone que esto incluso aumenta más la inmunogenicidad de dicho polipéptido.

Así, en una forma de realización se prefiere que el polipéptido inmunogénico comprenda un modelo de glicosilación que es similar a aquel del correspondiente (fragmento de) glicoproteína hZP3.

10 Sin embargo, como se conoce por la persona experta, técnicas recombinantes para la producción del polipéptido inmunogénico pueden producir polipéptidos que son no glicosilados o que contienen modelos de glicosilación diferentes, dependiendo de entre otras cosas la elección de las células huésped, como será explicado aquí más abajo.

15 Será claro para la persona experta, que el uso de polipéptidos recombinantes, teniendo modelos de glicosilación distintos a aquel del correspondiente (fragmento) de hZP3, está también totalmente dentro del campo de la presente invención y puede ser preferido en formas de realización determinadas, por ejemplo para cuestiones prácticas.

[0046] El presente método de inmunización preferiblemente comprende la administración de una fuente de fragmentos de polipéptidos inmunogénicamente activos, dichos fragmentos de polipéptido siendo seleccionados de fragmentos de proteína hZP3 y/o su homólogo tal y como se define aquí anteriormente, dichos fragmentos de polipéptido que comprenden CTL dominantes y/o epítomos de HTL y cuyos fragmentos están entre 18 y 45 aminoácidos de longitud.

20 Se ha observado que los péptidos que tienen una longitud entre 18 y 45 aminoácidos proporcionan propiedades inmunogénicas superiores como se describe en WO 02/070006.

25 Los péptidos pueden ser sintetizados ventajosamente químicamente y pueden opcionalmente ser (parcialmente) superpuestos y/o también se pueden unir a otras moléculas, péptidos o proteínas.

Los péptidos también se pueden fusionar para formar proteínas sintéticas, como en PCT/NL03/00929 y en Welters et al. (Vaccine. 2004 Dec 2,23(3):305-11).

30 También puede ser ventajoso añadir al término amino o carboxi del péptido fracciones químicas o aminoácidos (modificados o D) adicionales para aumentar la estabilidad y/o reducir la biodegradabilidad del péptido.

Para mejorar la inmunogenicidad / fracciones inmunoestimulantes pueden ser unidas, por ejemplo por lipidación o glicosilación.

35 Para mejorar la solubilidad del péptido, puede ser utilizada la adición de aminoácidos cargados o polares, para mejorar la solubilidad y aumentar la estabilidad *in vivo*.

[0047] Para fines de inmunización los polipéptidos inmunogénicos anteriormente mencionados según la invención también se pueden fusionar con proteínas tales como pero no limitadas a toxina/toxoide de tétanos, toxina/toxoide de difteria u otras moléculas portadoras.

40 Los polipéptidos según la invención también se pueden fusionar ventajosamente con proteínas de choque térmico, tal como gp96 (GRP94) (murino) endógeno recombinante como un portador para péptidos inmunodominantes como se describe en (referencias: Rapp UK and Kaufmann SH, Int Immunol. 2004 Apr; 16(4):597-605; Zugel U, Infect Immun. 2001 Jun;69(6):4164-7) o proteínas de fusión con Hsp70 (Triebel et al; WO9954464).

45 [0048] Los residuos de aminoácidos individuales de los presentes (poli)péptidos inmunogénicos de la invención se pueden incorporar en el péptido por un enlace peptídico o mimético de enlace peptídico.

Un mimético de enlace peptídico de la invención incluye modificaciones del esqueleto peptídico bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen modificaciones de amida nitrógeno, el α -carbono, amida carbonilo, sustitución completa del enlace amida, extensiones, deleciones o reticulaciones del esqueleto.

50 Ver, generalmente, Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. VII (Weinstein ed., 1983).

Diferentes modificaciones del esqueleto peptídico son conocidas, estas incluyen, ψ [CH₂S], ψ [CH₂NH], ψ [CSNH₂], ψ [NHCO], ψ [COCH₂] y ψ [(E) o (Z) CH=CH].

55 La nomenclatura usada más arriba, sigue aquella sugerida por Spatola, arriba.

En este contexto, ψ indica la ausencia de un enlace amida.

La estructura que reemplaza el grupo amida está especificado entre paréntesis.

[0049] Un mimético de aminoácidos también se puede incorporar en los polipéptidos.

60 Un "mimético de aminoácido" como se usa aquí es una fracción diferente de un aminoácido de origen natural que conformacionalmente y funcionalmente sirve como un sustituto para un aminoácido en un polipéptido de la presente invención.

Tal fracción sirve como un sustituto para un residuo de aminoácido si esta no interfiere con la capacidad del péptido para suscitar una respuesta inmune contra los epítomos de células T hZP3.

Miméticos de aminoácidos pueden incluir aminoácidos no proteínicos, tal como β -, γ -, δ -aminoácidos, β -, γ -, δ -iminoácidos (tal como ácido piperidina-4-carboxílico) al igual que muchos derivados de L α -aminoácidos.

Un número de miméticos de aminoácidos adecuados se conocen por el experto en la materia, estos incluyen ciclohexilalanina, ácido 3-ciclohexilpropiónico, L-adamantilo alanina, ácido adamantilacético y similares.

5 Miméticos de péptidos adecuados para péptidos de la presente invención se discuten por Morgan y Gainor, (1989) Ann. Repts. Med. Chem. 24:243-252.

[0050] Según una forma de realización preferida, el presente método comprende la administración de una composición que comprende uno o más de los presentes polipéptidos inmunogénicos tal y como se define más arriba, y al menos un excipiente.

10

Los excipientes se conocen bien en la técnica de farmacia y pueden por ejemplo encontrarse en libros de texto tales como Remington's pharmaceutical sciences, Mack Publishing, 1995.

[0051] El presente método para inmunización puede comprender además la administración, preferiblemente la coadministración, de al menos un adyuvante.

15

Adyuvantes pueden comprender cualquier adyuvante conocido en la técnica de vacunación y se pueden seleccionar manuales como Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 2004.

[0052] Los adyuvantes están aquí destinados a incluir cualquier sustancia o compuesto que, cuando se usan, en combinación con un antígeno, para inmunizar un humano o un animal, estimulan el sistema inmunológico, así provocando, aumentando o facilitando la respuesta inmune contra el antígeno, preferiblemente sin generar una respuesta inmune específica al adyuvante mismo.

20

Adyuvantes preferidos mejoran la respuesta inmune contra un antígeno dado por al menos un factor de 1.5, 2, 2.5, 5, 10 o 20, en comparación con la respuesta inmune generada contra el antígeno bajo las mismas condiciones pero en ausencia del adyuvante.

25

Pruebas para determinar la mejora de promedio estadístico de la respuesta inmune contra un antígeno dado como se produce por un adyuvante en un grupo de animales o seres humanos sobre un grupo de control correspondiente están disponibles en la técnica. El adyuvante es preferiblemente capaz de aumentar la respuesta inmune contra al menos dos antígenos diferentes.

30

El adyuvante de la invención usualmente será un compuesto que es extranjero a un humano, así excluyendo compuestos inmunoestimuladores que son endógenos a los seres humanos, tal como por ejemplo interleucinas, interferones y otras hormonas.

[0053] Un número de adyuvantes son bien conocidos por un experto en la técnica. Adyuvantes adecuados incluyen por ejemplo adyuvante de Freund incompleto, alumbre, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (tr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE), DDA (bromuro de 2-dimetildioctadecilamonio), poliIC, Poli-A-poli-U, RIBI™, GERBU™, Pam3™, Carbopol™, Specol™, Titermax™, toxoide tetánico, toxoide de difteria, proteínas de membrana externa meningocócica, proteína de difteria CRM₁₉₇.

35

Adyuvantes preferidos comprenden un ligando que se reconoce por un receptor tipo Toll (TLR) presente en células presentadoras de antígenos.

Varios ligandos reconocidos por TLR se conocen en la técnica e incluyen por ejemplo lipopéptidos (ver por ejemplo WO 04/110486), lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, lipoarabinomananos, lipoproteínas (de micoplasma o espiroquetas), ARN bicatenario (poli I:C), ADN no metilado, flagelina, ADN que contiene CpG, e imidazoquinolinas, también derivados de estos ligandos teniendo modificaciones químicas.

45

[0054] El método para inmunización puede comprender además la administración, preferiblemente la coadministración, de una molécula de unión CD40 para mejorar una respuesta de CTL y así mejorar los efectos terapéuticos de los métodos y composiciones de la invención.

50

El uso de moléculas de unión CD40 es descrito en WO 99/61065.

La molécula de unión CD40 es preferiblemente un anticuerpo o su fragmento o un ligando CD40 o una de sus variantes, y se puede adicionar separadamente o se puede comprender dentro de una composición según la corriente invención.

55

Para usos terapéuticos, los presentes polipéptidos inmunogénicos o secuencias de ácidos nucleicos que los codifican o las presentes composiciones que comprenden estos polipéptidos o secuencias de ácidos nucleicos que los codifican se administran a un paciente que sufre de un tumor de próstata y posiblemente su metástasis o a un paciente que ha recibido otros métodos de tratamiento de los tumores de próstata, por ejemplo cualquiera de los métodos convencionales descritos aquí antes, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta autoinmune primaria dirigida contra glicoproteínas ZP nativas y células tisulares que expresan glicoproteínas ZP.

60

Una cantidad suficiente para realizarlo está definida como una "dosis profilácticamente eficaz" o "terapéuticamente eficaz".

65

Tales dosificaciones eficaces dependerán de una variedad de factores con la condición y estado general de salud del paciente.

Así regímenes de dosificación se pueden determinar y ajustar por personal médico preparado para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico óptimo.

5

[0055] En el método uno o más polipéptidos inmunogénicos se administran típicamente a una dosificación de aproximadamente 1 µg/kg peso corporal del paciente o más al menos una vez.

Frecuentemente las dosificaciones son mayores de 10 µg/kg.

10

Según la presente invención las dosificaciones preferiblemente se encuentran en la gama de 1 µg/kg a 1 mg/kg.

15

[0056] Según una forma de realización preferida los regímenes de dosificación típicos comprenden administrar una dosificación de 1-1000 µg/kg, más preferiblemente 10-500 µg/kg, todavía más preferiblemente 10-150 µg/kg, una vez, dos veces o tres veces por semana durante un periodo de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas.

Según una forma de realización preferida 10-100 µg/kg se administra una vez por semana durante un periodo de una o dos semanas.

20

[0057] El método preferiblemente comprende la administración de los presentes polipéptidos inmunogénicos y composiciones que los comprenden por medio de la vía parenteral u oral, preferiblemente la vía parenteral.

En otra forma de realización de la invención, el método comprende la administración *ex vivo* de una composición comprendiendo los presentes péptidos inmunogénicos a células mononucleares desde la sangre del paciente, particularmente DC aisladas de la misma.

25

Un compuesto farmacéutico para facilitar la cosecha de DC puede ser usado, tal como Progenipoiatina.TM. (Monsanto, St. Louis, Mo.) o GM-CSF/IL-4.

Después de impulsar las DC con péptidos y lavado para eliminar péptidos no unidos, las DC se infunden de nuevo en el paciente.

En esta forma de realización, una composición es proporcionada que comprende DC impulsadas con péptido que presentan los epítomos impulsados con péptidos en moléculas HLA en una de sus superficies.

30

Métodos de inducción de una respuesta inmune utilizando DC impulsadas con péptidos *ex vivo* son conocidos por la persona experta.

35

[0058] Otro aspecto de la invención se refiere a un producto farmacéutico que comprende como ingrediente activo la presente fuente de un polipéptido tal y como se define aquí antes.

Más particularmente la preparación farmacéutica comprende como ingrediente activo uno o más de los polipéptidos inmunogénicos anteriormente mencionados seleccionados del grupo de proteínas hZP3, sus homólogos y fragmentos de dichas proteínas hZP3 y sus homólogos, o, alternativamente, un vector de terapia génica tal y como se define aquí más arriba.

40

[0059] Según una primera forma de realización se prevé una preparación farmacéutica comprendiendo uno o más de los polipéptidos inmunogénicos de la invención.

La concentración de dicho polipéptido en la composición farmacéutica puede variar mucho, es decir, de menos de aproximadamente 0,1% en peso, normalmente siendo al menos aproximadamente 1% en peso hasta tanto como 20% en peso o más.

45

[0060] La composición comprende preferiblemente al menos un portador farmacéuticamente aceptable además de la sustancia activa.

El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para entregar los polipéptidos inmunogénicos o vectores de terapia genética al paciente.

50

Para polipéptidos, agua esterilizada, alcohol, grasas, ceras, y sólidos inertes se pueden utilizar como el portador.

Adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes tampón, agentes de dispersión, y similares, también se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas.

55

[0061] Según una forma de realización particularmente preferida, la presente composición farmacéutica comprende un adyuvante, tal y como se define con más detalle aquí anteriormente.

Adyuvantes para incorporación en la presente composición son preferiblemente seleccionados del grupo de ligandos que se reconocen por un receptor tipo Toll (TLR) presente en células presentadoras de antígenos, incluyendo lipopéptidos (ver por ejemplo WO 04/110486), lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, lipoarabinomanano, lipoproteínas (de micoplasma o espiroquetas), ARN bicatenario (poli I:C), ADN no metilado, flagelina, ADN que contiene CpG, e imidazoquinolinas, también derivados de estos ligandos teniendo modificaciones químicas.

60

La persona experta será capaz de determinar las cantidades exactas de alguno de estos adyuvantes para ser incorporados en los presentes productos farmacéuticos para hacerlos suficientemente inmunogénicos.

Según otra forma de realización preferida, el presente producto farmacéutico puede comprender uno o más ingredientes adicionales que se utilizan para mejorar la inmunidad de CTL como se explica aquí anteriormente.

5 Según una forma de realización particularmente preferida la presente preparación farmacéutica comprende una molécula de unión CD40.

[0062] Métodos de producción de las composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos son descritos en las patentes US No.'s 5,789,543 y 6,207,718.

La forma preferida depende del modo destinado de administración y aplicación terapéutica.

10

[0063] Para terapia genética, los vectores, por ejemplo, un plásmido, fagémido, fago, cósmido, virus, retrovirus, episoma o elemento transponible, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido inmunogénico tal y como se define aquí anteriormente se puede incorporar en composiciones farmacéuticas.

15

Vectores de terapia genética se pueden entregar a un sujeto por, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (ver Pat. U.S. N° 5,328,470) o por inyección estereotáctica (ver por ejemplo, Chen et al., PNAS 91:3054-3057, 1994).

20

La composición farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede incluir una matriz de liberación lenta donde el vehículo de administración de gen es insertado.

20

Alternativamente, donde el vector de administración de gen completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovíricos, el producto farmacéutico puede incluir una o más células que producen el sistema de entrega de genes.

25

[0064] Los presentes polipéptidos inmunogénicos son preferiblemente administrados parenteralmente.

Los polipéptidos para preparaciones para administración parenteral deben ser estériles.

La esterilización se realiza fácilmente por membranas de filtración estériles a través de filtración, antes de o después de la liofilización y reconstitución.

30

La vía parenteral para administración del polipéptido es conforme a métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, subcutánea o intralesional.

35

El polipéptido se administra continuamente por infusión o por inyección en bolo.

Una composición típica para infusión intravenosa podría ser elaborada para contener 10 a 50 ml de NaCl estéril al 0,9% o glucosa al 5% opcionalmente suplementada con una solución de albúmina al 20% y entre 10 µg y 50 mg, preferiblemente entre 50 µg y 10 mg, del polipéptido.

40

Una composición farmacéutica típica para inyección intramuscular sería formada para contener, por ejemplo, 1-10 ml de agua tamponada estéril y entre 10 µg y 50 mg, preferiblemente entre 50 µg y 10 mg, del polipéptido de la presente invención.

40

Métodos para la preparación de composiciones administrables parenteralmente se conocen bien en la técnica y se describen con más detalle en varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

45

[0065] Para administración oral, la sustancia activa se puede administrar en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos, y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes, y suspensiones.

50

Componente(s) activo(s) se pueden encapsular en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo, tal como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados químicos de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio y similar.

50

Ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden adicionar para proporcionar color deseable, sabor, estabilidad, capacidad de tampón, dispersión u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice, lauril sulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similar.

55

Diluyentes similares pueden utilizarse para hacer pastillas comprimidas.

Tanto pastillas como cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación prolongada para proveer a la liberación continua de medicación durante un periodo de horas.

55

Pastillas comprimidas pueden ser azúcar recubierta o película recubierta para ocultar cualquier sabor desagradable y proteger la pastilla de la atmósfera, o recubierta entérica para desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal.

60

Formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener coloración y aromatización para aumentar la aceptación del paciente.

60

[0066] Los polipéptidos inmunogénicos para usar en la presente invención se pueden preparar utilizando técnicas recombinantes donde una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés se expresa en células huésped adecuadas tal como se describen en Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene editorial y Wiley-Interscience, Nueva York (1987) y en Sambrook y Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

65

- [0067] También ver, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:488 (describiendo mutagénesis sitio dirigida) y Roberts et al. (1987) Nature 328:731-734 or Wells, J.A., et al. (1985) Gene 34:315 (describiendo mutagénesis de casete).
- 5 [0068] Un ejemplo de la preparación de ZPA y ZPB humano recombinante, usando baculovirus se pueden encontrar en la publicación anteriormente mencionada por Martínez et al. [(1996) Journal of Reproduction and Fertility Supplement 50:35-41].
- 10 [0069] Ejemplos de la preparación de ZPA y ZPB humano recombinante, usando bacterias (*E. coli*), células de levadura (*Pichia pastoris*), células de insecto (virus de poliedrosis nuclear múltiple de *autographa californica*) y células de ovario de hámster chino (CHO) como sistemas de expresión se describen en una publicación por Harris et al. [(1999) Protein Expression and Purification 16:298-307].
- 15 [0070] Un aspecto de la invención así se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el presente polipéptido inmunogénico tal y como se define aquí antes.
Preferiblemente el vector es un vector de duplicación que incluye un origen de replicación (o secuencia de replicación autónomamente) que asegura multiplicación del vector en un huésped adecuado para el vector.
Alternativamente el vector es capaz de integrarse en el genoma de la célula huésped, por ejemplo, a través
20 de recombinación homóloga o de otro modo.
Un vector particularmente preferido es un vector de expresión donde una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido tal como se ha definido anteriormente, está operativamente enlazado a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped para el vector.
- 25 [0071] Como se utiliza en este caso, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, situados arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para RNA-polimerasa dependiente del ADN, sitios de iniciación de la transcripción y
30 cualquiera de las otras secuencias de ADN, incluyendo, pero no limitado a sitios de unión de factor de transcripción, sitios de unión a proteínas activadoras y represoras, y cualquiera de las otras secuencias de nucleótidos conocidas por un experto en la técnica para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción desde el promotor.
Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo muchas condiciones fisiológicas y evolutivas.
Un promotor "inducible" es un promotor que es regulado dependiendo de las condiciones fisiológicas o
35 evolutivas.
Un promotor "específico del tejido" solo es activo en tipos específicos de células/tejidos diferenciados.
- [0072] Vectores de expresión permiten que los polipéptidos inmunogénicos tales como se han definido anteriormente se preparen utilizando técnicas recombinantes donde una secuencia de nucleótidos que
40 codifica el polipéptido de interés se expresa en células adecuadas, por ejemplo células cultivadas o células de un organismo multicelular, tal como se describe en Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1987) y en Sambrook y Russell (2001, supra).
También ver, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:488 (describiendo mutagénesis sitio dirigida) y Roberts et al. (1987) Nature 328:731-734 o Well, J.A., et al. (1985) Gene 34:315 (describiendo mutagénesis de
45 casete).
- [0073] Típicamente, ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos deseados se usan en vectores de expresión.
La frase "vector de expresión" generalmente se refiere a secuencias de nucleótidos que son capaces de
50 afectar la expresión de un gen en huéspedes compatibles con tales secuencias.
Estos vectores de expresión típicamente incluyen por lo menos secuencias de promotor adecuadas y opcionalmente, señales de terminación de la transcripción.
Factores adicionales necesarios o que ayudan a efectuar expresión también pueden usarse como se describe en este caso.
- 55 ADN que codifica un polipéptido se incorpora en constructos de ADN capaces de introducirse en y expresarse en un cultivo celular *in vitro*.
Específicamente, constructos de ADN son adecuados para la replicación en un huésped procariótico, tales como bacterias, por ejemplo, *E. coli*, o se pueden introducir en una línea celular eucariota cultivada de mamífero, planta, insecto, por ejemplo, Sf9, levadura, hongos u otras.
- 60 [0074] Constructos de ADN preparados para la introducción en un huésped particular típicamente incluye un sistema de replicación reconocido por el huésped, el segmento de ADN destinado que codifica el polipéptido deseado, y la iniciación transcripcional y traslacional y secuencias reguladoras de terminación operativamente enlazadas al segmento codificante del polipéptido.
- 65 Un segmento de ADN es "operativamente enlazado" cuando se coloca en una relación funcional con otro segmento de ADN.

Por ejemplo, un promotor o intensificador está operativamente enlazado a una secuencia codificante si estimula la transcripción de la secuencia.

El ADN para una secuencia señal está operativamente enlazado al ADN que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido.

5 Generalmente, las secuencias de ADN que están operativamente enlazadas son contiguas, y, en el caso de una secuencia señal, tanto en la fase contigua como de lectura.

Sin embargo, los potenciadores no necesitan ser contiguos con las secuencias codificantes cuya transcripción controlan.

10 La conexión se realiza por unión a sitios de restricción convenientes o a adaptadores o enlazadores insertados en su lugar.

[0075] La selección de una secuencia promotora apropiada generalmente depende de la célula huésped seleccionada para la expresión del segmento de ADN.

15 Ejemplos de secuencias de promotor adecuadas incluyen promotores procarióticos, y eucarióticos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

Las secuencias reguladoras transcripcionales típicamente incluyen un intensificador heterólogo o promotor que se reconoce por el huésped.

20 La selección de un promotor apropiado depende del huésped, pero promotores tales como los promotores *trp*, *lac* y de fago, promotores de ARNt y promotores de enzima glicolítica son conocidos y disponibles (ver, por ejemplo Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

Vectores de expresión incluyen el sistema de replicación y secuencias reguladoras transcripcionales y traducionales con el sitio de inserción para el segmento codificante del polipéptido pueden ser empleados.

25 Ejemplos de combinaciones factibles de líneas celulares y vectores de expresión son descritos en Sambrook y Russell (2001; *supra*) y en Metzger et al. (1988) *Nature* 334: 31-36.

Por ejemplo, vectores de expresión adecuados se pueden expresar en células de levadura, por ejemplo *S.cerevisiae*, por ejemplo, células de insecto, por ejemplo, células Sf9, células mamíferas, por ejemplo, células CHO y células bacterianas, por ejemplo, *E. coli*.

30 Como los procariotas no poseen los orgánulos necesarios para glicosilación, los polipéptidos producidos por procariotas no tendrán cadenas laterales de carbohidrato.

Eucariotas tienen la maquinaria de glicosilación, pero células de levadura darán un modelo de glicosilación diferente al de las células mamíferas.

Por lo tanto se prefiere usar un sistema de expresión que da el modelo de glicosilación más "natural".

Para este fin, las células mamíferas son las más preferidas.

35 Líneas celulares con maquinaria de glicosilación similar a la de un humano pueden ser particularmente útiles, al suponerse que los antígenos según la presente invención con un modelo de glicosilación similar al de los glicopolipéptidos de zona pelúcida humanos correspondientes pueden tener inmunogenicidad aumentada.

Líneas celulares adecuadas incluyen células CHO, véase, por ejemplo, Pat. U.S N° 5,272,070 y en particular líneas celulares de ovario o de folículo humano, cf. WO 99/42581.

40 [0076] Mutagénesis y expresión *in vitro* de proteínas mutantes son descritas generalmente en Ausubel et al. (1987; *supra*) y en Sambrook y Russell (2001, *supra*).

También véase, Kunkel (1985, *supra*; que describen la mutagénesis sitio dirigida) y Roberts et al. (1987, *supra*; que describen la mutagénesis de casete).

45 [0077] Otro método para la preparación de los polipéptidos inmunogénicos presentes es emplear un sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

El ADN que codifica un polipéptido se clona en un vector de expresión como se describe *supra*.

El vector de expresión es luego transcrito y traducido *in vitro*.

El producto de traducción se puede usar directamente o ser primero purificado.

50 Los polipéptidos resultantes de la traducción *in vitro* típicamente no contienen las modificaciones postraduccionales presentes en los polipéptidos sintetizados *in vivo*, aunque debido a la presencia inherente de los microsomas alguna modificación postraducciona puede ocurrir.

Métodos para la síntesis de polipéptidos por transferencia *in vitro* son descritos por, por ejemplo, Berger & Kimmel, *Methods in Enzymology*, volumen 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987.

60 [0078] Otro aspecto de la invención así se refiere a un huésped que comprende un vector tal como se ha definido anteriormente.

Las células huésped pueden ser células huésped procariotas o eucariotas como se ha indicado anteriormente.

La célula huésped puede ser una célula huésped que es adecuada para cultivo en medios líquidos o sólidos.

Alternativamente, la célula huésped es una célula que es parte de un organismo multicelular tal como una planta transgénica o animal, preferiblemente un animal no humano.

65 [0079] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la producción del presente polipéptido inmunogénico tal como se ha definido anteriormente.

El método comprende el paso del cultivo de una célula huésped tal como se ha definido anteriormente bajo condiciones propicias para la expresión del polipéptido.

Opcionalmente el método puede comprender la recuperación del polipéptido.

5 El polipéptido puede ser recuperado por ejemplo desde el medio de cultivo por técnicas de purificación de proteína estándar, incluyendo una variedad de métodos de cromatografía conocidos en la técnica per se.

[0080] Otro aspecto de la invención se refiere a un animal transgénico que comprende en sus células germinales y somáticas un vector tal como se ha definido anteriormente.

El animal transgénico es preferiblemente un animal no humano.

10 Métodos para generar animales transgénicos son por ejemplo descritos en WO 01/57079 y en las referencias citadas en el mismo.

Tales animales transgénicos se pueden utilizar en un método para la producción de un polipéptido tal como se ha definido anteriormente, el método comprendiendo el paso de la recuperación de un fluido corporal a partir de un animal transgénico comprendiendo el vector o su descendiente hembra, donde el fluido corporal contiene el polipéptido, y, opcionalmente recuperación del polipéptido desde el fluido corporal.

15 Tales métodos son también descritos en WO 01/57079 y en las referencias citadas en el mismo.

El fluido corporal con el polipéptido es preferiblemente sangre o más preferiblemente leche.

[0081] Otro aspecto de la invención se refiere a una planta transgénica que comprende en sus células un vector tal como se ha definido anteriormente.

20 Métodos para generar plantas transgénicas son por ejemplo descritos en U.S. 6,359,196 y en las referencias citadas en el mismo.

Tales plantas transgénicas se pueden utilizar en un método para la producción de un polipéptido tal como se ha definido anteriormente, el método comprendiendo el paso de la recuperación de una parte de una planta transgénica que comprende en sus células el vector o una parte de un descendiente de tal planta transgénica, por la cual la parte de la planta contiene el polipéptido, y, opcionalmente recuperación del polipéptido desde la parte de la planta.

25 Tales métodos son también descritos en U.S. 6,359,196 y en las referencias citadas en el mismo.

30 [0082] La invención es posteriormente ilustrada en los siguientes ejemplos, que no están destinados a limitar el ámbito de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

35 Experimento 1: expresión de ZP3 en las muestras de carcinoma de próstata humana

[0083] La expresión de ZP3 en el tejido de tumor de próstata humana se determina utilizando métodos inmunohistoquímicos.

40 Muestras de tejidos de tumor de próstata originadas de pacientes diferentes fueron obtenidas de un instituto de patologías en los Países Bajos.

En total 16 muestras de carcinoma de próstata humano y otras 6 muestras de tumor de próstata de otras fuentes diferentes fueron teñidas para ZP3 (IHC & IF), alfa-metil-CoA-Racemasa AMACR (un marcador IHC de carcinoma de próstata como 85% de todos los tintes de cáncer de próstata para éstas) y citoqueratina 5/6 (para células basales).

45 [0084] Determinaciones inmunohistoquímicas fueron hechas con anticuerpos ZP3 humanos, anticuerpos policlonales de conejo para ZP3 recombinante humano y con anticuerpos policlonales de cabra.

[0085] Muestras de tejido de próstata normal sirvieron como control.

50 Ovocitos inmaduros recogidos de folículos antrales después de la estimulación ovárica para IVF fueron teñidos como controles positivos.

Además, unas muestras de hígado normal y tejido de testículo normal fueron usadas como unos controles negativos.

55 [0086] El siguiente protocolo de IHC fue usado para todas las muestras

Día 1

[0087]

60 1. Lámina de incubación en 57°C durante 30 min.
2. Desparafinización e hidratación:

- 65 a) Xileno - 2 x 5 min,
b) Abs. EtOH - 2 x 5 min,
c) 96% EtOH - 2 x 5 min,
d) 70% EtOH - 2 x 5min,

ES 2 621 806 T3

- e) 50% EtOH - 2 x 5 min,
- f) dH₂O - 1 x 5 min,
- g) PBS - 1 x 5 min.

5 3. Recuperación del antígeno:

- a) 10mM tampón de citrato sódico (pH 6.0) en horno microondas durante 15 min,
- b) Enfriar durante 15-20 min,
- c) PBS - 3 x 5 min.

10

4. Enfriamiento rápido de peroxidasa endógena (RT en la oscuridad, 3% H₂O₂ en metanol - 10 min recomendado para secciones de parafina)

5. PB S - 3 x 5 min.

6. Bloqueo - NGS 15% en TPBS - 90 min (RT en cámara oscura/humidificada).

15

7. Anticuerpo primario 1:250 con 5% NGS en TPBS - durante la noche/espacio enfriado/cámara humidificada).

[0088] Para control positivo (ovario WT) 1:600 anticuerpo primario diluido fue usado. Para secciones tumorales, el anticuerpo fue más concentrado - 1:250.

20

Día 2

[0089]

8. PB S - 3 x 5 min.

25

9. Anticuerpo secundario - anticonejo de cabra (1:1000) con 5% NGS en TPBS - 90 min (RT / cámara humidificada).

10. PBS-3 x 5 5 min

11. Incubación con reactivo ABC diluido 1:50 en PBS (60 min/RT en cámara oscura/humidificada).

12. PBS - 3 x 5 min.

30

13. DBA

14. Aqua - 2 x 5 min.

15. Hematoxilina - 60 s.

16. Aqua - 2 x 5 min.

17. Deshidratación:

35

a) 50% EtOH - 2 x 5 min

b) 70% EtOH - 2 x 5 min

c) 96% EtOH - 2 x 5min

d) Abs. EtOH - 2 x 5 min

40

e) Xileno - 2 x 5 min (ultra claro)

18. Montar con DPX.

45

[0090] (50.000) Células fueron sembradas cada vez en tapas de cristal (que se usan normalmente para IHC). Después de 24h o menos (dependiendo de la línea celular) las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 4% PFA (15 min).

Luego las células fueron lavadas nuevamente con PBS (3x5 min).

Después del lavado, la autofluorescencia fue bloqueada con 100mM NH₄Cl (3min RT).

50

En la siguiente etapa 15% NGS fue usada en combinación con 5% BSA en PBS con 0.1% Tritón X-100 (90 min/RT / cámara humidificada).

Anticuerpo primario fue diluido 1:200 (puede ser más alto) en 5%NGS en T-PBS (durante la noche/espacio enfriado/cámara humidificada).

Tras la incubación con anticuerpos primarios, las células fueron lavadas (3x5 min, T-PBS) e incubadas con anticuerpo secundario AlexaFluor 594 (anticonejo de cabra) diluido 1:100 (90 min/RT/cámara humidificada).

55

Finalmente, las células fueron lavadas (3x5min; PBS) y contrateñidas (DAPI-Ultra Cruz).

Soluciones y reactivos

[0091]

60

• xileno (o Histoclear)

• etanol

• H₂O destilado

• Hematoxilina

• 10X PBS (solución salina tamponada con fosfato):

65

• 0.58 M fosfato sódico dibásico (Na₂HPO₄), 0.17 M fosfato sódico monobásico (NaH₂PO₄), 0.68 M NaCl. Para preparar 1 litro de 10X PBS: combinar 82,33 g Na₂HPO₄*4H₂O, 23.45 g NaH₂PO₄*H₂O y 40 g NaCl.

Ajustar pH a 7.4.

- 10 mM tampón de citrato sódico:

para preparar 1 litro, añadir 2.94 g citrato sódico a 1 litro dH₂O.

Ajustar pH a 6.0

- 5
- 1 % tampón de (oxidación) de peróxido de hidrógeno: en 50ml: 15µl Triton-X, 10ml metanol, 40ml 1% H₂O₂ (conc. final)
 - solución de bloqueo: 10% FBS y 10% BSA en PBS
 - reactivo ABC (Vectastain ABC kit, Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA): preparar según las instrucciones del fabricante 30 minutos antes del uso
- 10
- reactivo DAB: usar según las instrucciones del fabricante

[0092] En los controles positivos, anticuerpos detectan proteínas en el ZP que rodea el ovocito humano (resultados no mostrados).

Proteínas ZP3 están también presentes en el citoplasma de ovocito.

- 15
- Ningún tinte positivo se detecta en secciones de las muestras de tejido tumoral de próstata cuando el anticuerpo primario es omitido (resultados no mostrados).
Ningún tinte positivo es observado, con cada uno de los anticuerpos ZP, en el tejido de hígado (resultados no mostrados), próstata normal o testículo humano normal (figuras 3C y 3D respectivamente).

- 20
- [0093] En las muestras de tumor de próstata, la presencia del ZP3 se confirma por áreas del tinte del tejido positivo para ZP3, con intensidades variables entre las muestras obtenidas de distintos pacientes (figuras 3A y 3B).

- 25
- [0094] En general, el tinte positivo de ZP3 se correlacionó estrictamente con el marcador de cáncer de próstata alfa-metil-CoA-Racemasa (AMACR) para el carcinoma de próstata.
Esta coloración de tumores positiva para expresión de ZP3 se puede tratar por inmunización con antígenos de ZP3 conforme a la presente invención.

Ejemplo 2: expresión de ZP3 en la línea celular de cáncer de próstata humano (PC)

- 30
- [0095] Expresión de la proteína de zona pelúcida 3 (ZP3) en la línea celular de cáncer de próstata humana (PC) y cáncer de próstata fue demostrado en ARNm (A) y a nivel de proteína (B) usando técnicas de electroforesis de Western blot y RT-PR estándar.
Como se esperaba, se observaron bandas únicas de producto RT-PR (183 par de bases) y electrofóresis de Western blot (55 kDa) (figura 4A y B).
- 35
- ARNm total y proteína de ovario de humano normal (hOV) y testículo (hTE) han sido usados como control negativo y positivo respectivamente.

- 40
- [0096] Localización citoplásmica de ZP3 fue demostrada en las células PC-3 (figura 5A) por visualización de inmunofluorescencia usando IgG anticonejo de cabra -Alexa Flour 594 (rojo).

- 45
- [0097] La selección del ARNm total de muestras de cáncer de próstata marcada como un Gleason 6-9 (n=10) por RT-PCR afirmó la presencia de los productos de ADN (183 pares de bases) equivalentes al fragmento de ZP3 (figura 6).

Además, muestras de próstata fueron controladas para la presencia de la expresión del receptor andrógeno (AR) y de receptor de hormonas liberadoras de hormonas luteinizantes (LHR) que permanece importante en el desarrollo (AR) y progresión (AR y LHR) del cáncer de próstata (Heinlein y Chang7 Pinski et al.8).

Descripción de las figuras

- 50
- [0098]
Figura 1: Histología (HE) del adenocarcinoma de próstata humana (A; B), próstata normal (C) y testículo humano normal (D).
Glándulas cancerosas se marcan por flechas.
- 55
- Figura 2: tinción inmunohistoquímica con dubel α -metilacil coenzima A racemasa (AMACR (rojo)) y citoqueratina 5/6 (CK5/6 (marrón)) en el adenocarcinoma de próstata humana (A; B), próstata normal (C) y en testículo humano normal (D).
La doble tinción inmune fue realizada como marcadores adicionales a la histología para la evaluación apropiada de las muestras de próstata (Trpkov et al.9).
- 60
- Células epiteliales de carcinoma secretoras de las glándulas de próstata mostraron fuerte tinción roja granular fina citoplásmica circunferencial para AMACR (A, B, flechas) y fueron negativas para CK5/6 (positivo para las células epiteliales basales de la próstata normal).
Una tinción típica marrón oscuro CK5/6 de las células basales fue observada en el epitelio prostático normal que es negativo para AMACR (L).
- 65
- Secciones de testículo humano usadas como un control negativo para la coloración inmunitaria doble quedó negativa para ambos AMACR, y CK5/6 (D).

Figura 3: tinción inmunohistoquímica de ZP3 única (marrón) en el adenocarcinoma de próstata humana (A; B), próstata normal (C) y en el testículo humano normal (D).

La tinción citoplásmica positiva y específica para ZP3 fue observada en la glándula/tejido canceroso del carcinoma prostático teñido positivamente para AMACR y negativamente para CK5/6 (A, B).

Próstata humana normal fue libre de coloración para ZP3 de forma similar a AMACR pero no CK5/6 (C).

Secciones de testículo humano fueron negativas para ZP3 (D).

Figura 4: Expresión de la proteína de zona pelúcida 3 (ZP3) en la línea celular de cáncer de próstata humana (PC) y cáncer de próstata a nivel de ARNm (A) y de proteína (B).

Figura 5: Visualización de inmunofluorescencia de localización citoplásmica del ZP3 en células PC-3 .

Figura 6: ARNm totales de muestras de cáncer de próstata marcadas como un Gleason 6-9 (n=10) por RT-PCR para determinar la presencia de ZP3, receptor andrógeno (AR) y receptor de hormonas liberadoras de hormona luteinizante (LHR).

REFERENCIAS

[0099]

1. Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 152:163. HLA_BIND (http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)

2. Rammensee, Friede, Stevanovic, MHC ligands and peptide motifs: 1 st listing, *Immunogenetics* 41, 178-228, 1995; SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) and Rammensee, Bachmann, Stevanovic: MHC ligands and peptide motifs. *Landes Bioscience 1997* (International distributor - except North America: Springer Verlag GmbH & Co. KG, Tiergartenstr. 17, D-69121 Heidelberg)

3. Buus S, Lauemoller SL, Worning P, Kesmir C, Frimurer T, Corbet S, Fomsgaard A, Hilden J, Holm A, Brunak S. Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee' artificial neural network approach, in *Tissue Antigens.*, 62:378-84, 2003; NetMHC (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>)

4. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O., Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.*, 12:1007-17, 2003.

5. Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach, Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Hvid CS, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O., *Bioinformatics*, 20(9):1388-97, 2004.

6. Sturniolo, T. et al., *Nature Biotechnology* 17, 555-562, 1999, Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA chips and virtual HLA class II matrices; TEPITOPE (<http://www.vaccinome.com/pages/597444/>).

7. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev.* 2004, 25(2):276-308.

8. Pinski J, Xiong S, Wang Q, Stanczyk F, Hawes D, Liu SV. Effect of luteinizing hormone on the steroidogenic pathway in prostate cancer. *Prostate.* 2011, 71(8):892-8.

9. Trpkov K, Bartczak-McKay J, Yilmaz A. Usefulness of cytokeratin 5/6 and AMACR applied as double sequential immunostains for diagnostic assessment of problematic prostate specimens. *Am J Clin Pathol.* 2009; 132(2):211-20.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0100]

<110> Pantarhei Bioscience B.V.

<120> Método inmunoterapéutico para tratar cáncer de próstata

<130> P6032277EP

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 638

<212> PRT

<213> human

<400> 1

ES 2 621 806 T3

Met Ala Gly Gly Ser Ala Thr Thr Trp Gly Tyr Pro Val Ala Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Val Ala Thr Leu Gly Leu Gly Arg Trp Leu Gln Pro Asp Pro
20 25 30

Gly Leu Pro Gly Leu Arg His Ser Tyr Asp Cys Gly Ile Lys Gly Met
35 40 45

Gln Leu Leu Val Phe Pro Arg Pro Gly Gln Thr Leu Arg Phe Lys Val
50 55 60

Val Asp Glu Phe Gly Asn Arg Phe Asp Val Asn Asn Cys Ser Ile Cys
65 70 75 80

Tyr His Trp Val Thr Ser Arg Pro Gln Glu Pro Ala Val Phe Ser Ala
85 90 95

Asp Tyr Arg Gly Cys His Val Leu Glu Lys Asp Gly Arg Phe His Leu
100 105 110

Arg Val Phe Met Glu Ala Val Leu Pro Asn Gly Arg Val Asp Val Ala
115 120 125

Gln Asp Ala Thr Leu Ile Cys Pro Lys Pro Asp Pro Ser Arg Thr Leu
130 135 140

Asp Ser Gln Leu Ala Pro Pro Ala Met Phe Ser Val Ser Thr Pro Gln
145 150 155 160

Thr Leu Ser Phe Leu Pro Thr Ser Gly His Thr Ser Gln Gly Ser Gly
165 170 175

His Ala Phe Pro Ser Pro Leu Asp Pro Gly His Ser Ser Val His Pro
180 185 190

Thr Pro Ala Leu Pro Ser Pro Gly Pro Gly Pro Thr Leu Ala Thr Leu
195 200 205

Ala Gln Pro His Trp Gly Thr Leu Glu His Trp Asp Val Asn Lys Arg
210 215 220

Asp Tyr Ile Gly Thr His Leu Ser Gln Glu Gln Cys Gln Val Ala Ser

ES 2 621 806 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | | |
| Gly | Phe | Glu | Asp | Ser | Tyr | Gly | Gln | Glu | Pro | Thr | Leu | Gly | Pro | Thr | Asp | | |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | | |
| Ser | Asn | Gly | Asn | Ser | Ser | Leu | Arg | Pro | Leu | Leu | Trp | Ala | Val | Leu | Leu | | |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | | |
| Leu | Pro | Ala | Val | Ala | Leu | Val | Leu | Gly | Phe | Gly | Val | Phe | Val | Gly | Leu | | |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | | |
| Ser | Gln | Thr | Trp | Ala | Gln | Lys | Leu | Trp | Glu | Ser | Asn | Arg | Gln | | | | |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | | | |

5 <210> 2
 <211> 745
 <212> PRT
 <213> human

<400> 2

ES 2 621 806 T3

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

ES 2 621 806 T3

Thr Gly Val Thr His Tyr Val Gln Gly Asn Ser His Leu Tyr Met Val
 225 230 235 240

Ser Leu Lys Leu Thr Phe Ile Ser Pro Gly Gln Lys Val Ile Phe Ser
 245 250 255

Ser Gln Ala Ile Cys Ala Pro Asp Pro Val Thr Cys Asn Ala Thr His
 260 265 270

Met Thr Leu Thr Ile Pro Glu Phe Pro Gly Lys Leu Lys Ser Val Ser
 275 280 285

Phe Glu Asn Gln Asn Ile Asp Val Ser Gln Leu His Asp Asn Gly Ile
 290 295 300

Asp Leu Glu Ala Thr Asn Gly Met Lys Leu His Phe Ser Lys Thr Leu
 305 310 315 320

Leu Lys Thr Lys Leu Ser Glu Lys Cys Leu Leu His Gln Phe Tyr Leu
 325 330 335

Ala Ser Leu Lys Leu Thr Phe Leu Leu Arg Pro Glu Thr Val Ser Met
 340 345 350

Val Ile Tyr Pro Glu Cys Leu Cys Glu Ser Pro Val Ser Ile Val Thr
 355 360 365

Gly Glu Leu Cys Thr Gln Asp Gly Phe Met Asp Val Glu Val Tyr Ser
 370 375 380

Tyr Gln Thr Gln Pro Ala Leu Asp Leu Gly Thr Leu Arg Val Gly Asn
 385 390 395 400

Ser Ser Cys Gln Pro Val Phe Glu Ala Gln Ser Gln Gly Leu Val Arg
 405 410 415

Phe His Ile Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Tyr Lys Phe Glu Asp
 420 425 430

Asp Lys Val Val Tyr Glu Asn Glu Ile His Ala Leu Trp Thr Asp Phe
 435 440 445

Pro Pro Ser Lys Ile Ser Arg Asp Ser Glu Phe Arg Met Thr Val Lys
 450 455 460

Cys Ser Tyr Ser Arg Asn Asp Met Leu Leu Asn Ile Asn Val Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Thr Pro Pro Val Ala Ser Val Lys Leu Gly Pro Phe Thr Leu Ile
 485 490 495

Leu Gln Ser Tyr Pro Asp Asn Ser Tyr Gln Gln Pro Tyr Gly Glu Asn
 500 505 510

Glu Tyr Pro Leu Val Arg Phe Leu Arg Gln Pro Ile Tyr Met Glu Val
 515 520 525

Arg Val Leu Asn Arg Asp Asp Pro Asn Ile Lys Leu Val Leu Asp Asp
 530 535 540

Cys Trp Ala Thr Ser Thr Met Asp Pro Asp Ser Phe Pro Gln Trp Asn
 545 550 555 560

ES 2 621 806 T3

Val Val Val Asp Gly Cys Ala Tyr Asp Leu Asp Asn Tyr Gln Thr Thr
565 570 575

Phe His Pro Val Gly Ser Ser Val Thr His Pro Asp His Tyr Gln Arg
580 585 590

Phe Asp Met Lys Ala Phe Ala Phe Val Ser Glu Ala His Val Leu Ser
595 600 605

Ser Leu Val Tyr Phe His Cys Ser Ala Leu Ile Cys Asn Arg Leu Ser
610 615 620

Pro Asp Ser Pro Leu Cys Ser Val Thr Cys Pro Val Ser Ser Arg His
625 630 635 640

Arg Arg Ala Thr Gly Ala Thr Glu Ala Glu Lys Met Thr Val Ser Leu
645 650 655

Pro Gly Pro Ile Leu Leu Leu Ser Asp Asp Ser Ser Phe Arg Gly Val
660 665 670

Gly Ser Ser Asp Leu Lys Ala Ser Gly Ser Ser Gly Glu Lys Ser Arg
675 680 685

Ser Glu Thr Gly Glu Glu Val Gly Ser Arg Gly Ala Met Asp Thr Lys
690 695 700

Gly His Lys Thr Ala Gly Asp Val Gly Ser Lys Ala Val Ala Ala Val
705 710 715 720

Ala Ala Phe Ala Gly Val Val Ala Thr Leu Gly Phe Ile Tyr Tyr Leu
725 730 735

Tyr Glu Lys Arg Thr Val Ser Asn His
740 745

<210> 3
<211> 424
<212> PRT
<213> human
<400> 3

5

ES 2 621 806 T3

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

ES 2 621 806 T3

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

<210> 4
<211> 540
<212> PRT
<213> human

5

<400> 4

ES 2 621 806 T3

Met Trp Leu Leu Arg Cys Val Leu Leu Cys Val Ser Leu Ser Leu Ala
1 5 10 15

Val Ser Gly Gln His Lys Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Ser Ser Val Leu
20 25 30

His Cys Gly Pro Trp Ser Phe Gln Phe Ala Val Asn Leu Asn Gln Glu
35 40 45

Ala Thr Ser Pro Pro Val Leu Ile Ala Trp Asp Asn Gln Gly Leu Leu
50 55 60

His Glu Leu Gln Asn Asp Ser Asp Cys Gly Thr Trp Ile Arg Lys Gly
65 70 75 80

Pro Gly Ser Ser Val Val Leu Glu Ala Thr Tyr Ser Ser Cys Tyr Val
85 90 95

Thr Glu Trp Asp Ser His Tyr Ile Met Pro Val Gly Val Glu Gly Ala
100 105 110

Gly Ala Ala Glu His Lys Val Val Thr Glu Arg Lys Leu Leu Lys Cys
115 120 125

Pro Met Asp Leu Leu Ala Arg Asp Ala Pro Asp Thr Asp Trp Cys Asp
130 135 140

Ser Ile Pro Ala Arg Asp Arg Leu Pro Cys Ala Pro Ser Pro Ile Ser
145 150 155 160

Arg Gly Asp Cys Glu Gly Leu Gly Cys Cys Tyr Ser Ser Glu Glu Val
165 170 175

Asn Ser Cys Tyr Tyr Gly Asn Thr Val Thr Leu His Cys Thr Arg Glu
180 185 190

Gly His Phe Ser Ile Ala Val Ser Arg Asn Val Thr Ser Pro Pro Leu
195 200 205

Leu Leu Asp Ser Val Arg Leu Ala Leu Arg Asn Asp Ser Ala Cys Asn
210 215 220

Pro Val Met Ala Thr Gln Ala Phe Val Leu Phe Gln Phe Pro Phe Thr
225 230 235 240

Ser Cys Gly Thr Thr Arg Gln Ile Thr Gly Asp Arg Ala Val Tyr Glu
245 250 255

Asn Glu Leu Val Ala Thr Arg Asp Val Lys Asn Gly Ser Arg Gly Ser
260 265 270

Val Thr Arg Asp Ser Ile Phe Arg Leu His Val Ser Cys Ser Tyr Ser
275 280 285

Val Ser Ser Asn Ser Leu Pro Ile Asn Val Gln Val Phe Thr Leu Pro

ES 2 621 806 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende una fuente de un polipéptido que comprende un epítipo de célula T de zona pelúcida nativo restringido a MHC de clase I y/o MHC de clase II o su variante inmunológicamente activa, para usar en un método para tratamiento terapéutico y/o profiláctico de cáncer de próstata y/o su metástasis en un humano, donde dicho polipéptido es seleccionado de hZP3, sus homólogos y fragmentos inmunológicamente activos de hZP3 y sus homólogos.
- 10 2. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, donde el método de tratamiento es un método de tratamiento terapéutico.
- 15 3. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, donde el método de tratamiento es un método de prevención de metástasis y/o recurrencia de cáncer de próstata.
- 20 4. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 3, donde el método se combina con cirugía, criocirugía, terapia de radiación, incluyendo braquiterapia y radiación con rayo externo, ultrasonido focalizado de intensidad alta (HIFU), terapia hormonal o quimioterapia, o una de sus combinaciones.
- 25 5. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de un polipéptido inmunogénico seleccionado de hZP3, sus homólogos y fragmentos inmunológicamente activos de dichas proteínas y sus homólogos; o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido inmunogénico.
- 30 6. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye una cantidad eficaz de un polipéptido inmunogénico seleccionado de hZP3, sus homólogos y fragmentos inmunológicamente activos de dichas proteínas y sus homólogos.
- 35 7. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 6, donde dicho polipéptido inmunogénico es seleccionado de hZP3 y sus fragmentos inmunológicamente activos.
- 40 8. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, donde hZP3 comprende el esqueleto de polipéptido de protocolo de secuencia SEQ ID nº 3 o una de sus variantes alélicas, preferiblemente una variante alélica resultante de un polimorfismo de nucleótido único.
- 45 9. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, donde dicho polipéptido se prepara utilizando una técnica recombinante donde una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se expresa por una célula huésped adecuada.
- 50 10. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dicha fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de fragmentos de polipéptido inmunogénico, dichos fragmentos de polipéptido siendo seleccionados de fragmentos de hZP3 y/o sus homólogos, estos fragmentos están entre 18 y 45 aminoácidos de longitud; o secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos de hZP3.
- 55 11. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicha fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos inmunogénicos diferentes, dicho uno o más polipéptidos inmunogénicos juntos comprendiendo al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, epítopos de unión restringidos de MHC de clase I y de MHC de clase II comprendidos en una glicoproteína hZP3 nativa; homólogo de dicho uno o más polipéptidos inmunogénicos; o una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos o sus homólogos.
- 60 12. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicha fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de un polipéptido inmunogénico que comprende al menos 50%, más preferiblemente al menos 70 % del esqueleto de aminoácido completo de glicoproteína de hZP3; un homólogo de dicho polipéptido inmunogénico; o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido o su homólogo.
- 65 13. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicha fuente de un polipéptido comprende una cantidad eficaz de una pluralidad de diferentes fragmentos de polipéptido superpuestos de glicoproteína hZP3, estos diferentes fragmentos de polipéptido superpuestos están entre 18 y 60 aminoácidos de longitud y juntos comprenden al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, del esqueleto de aminoácido completo de dicha glicoproteína hZP3; homólogos de dichos fragmentos de polipéptido; o una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos de polipéptido o sus homólogos.

14. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el polipéptido es glicosilado.

5 15. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido comprende un modelo de glicosilación que es similar a aquel de la glicoproteína hZP3 nativa o su fragmento.

10 16. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el método comprende la administración, preferiblemente la coadministración, de al menos un adyuvante.

Fig 1a

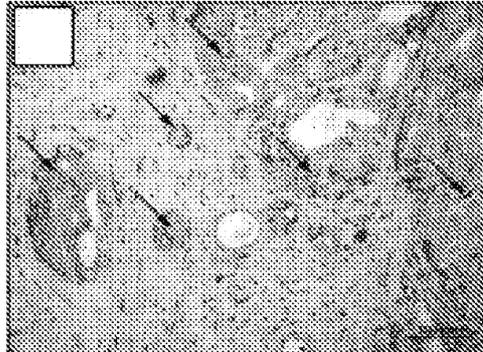


Fig 1b

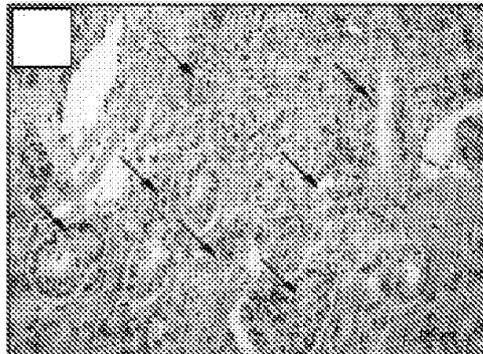


Fig 1c

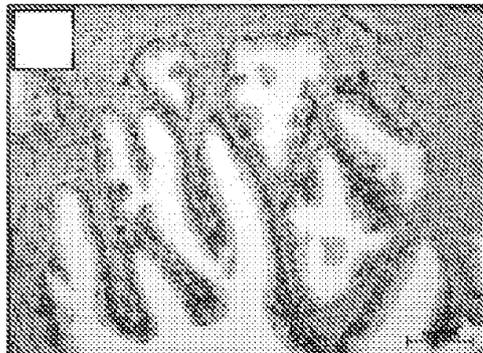


Fig 1d

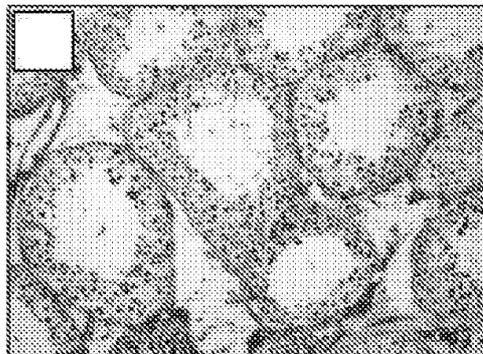


Fig 2a

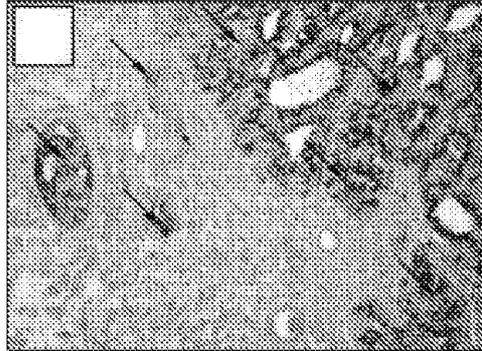


Fig 2b

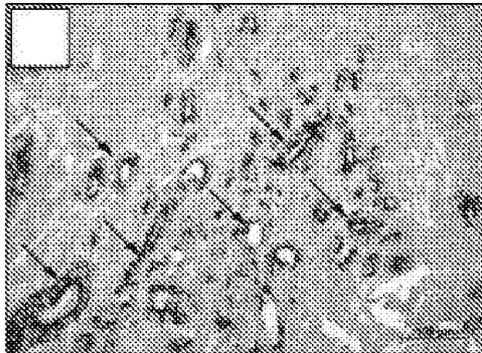


Fig 2c



Fig 2d

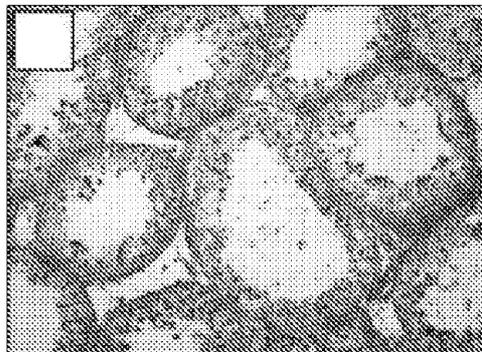


Fig 3a

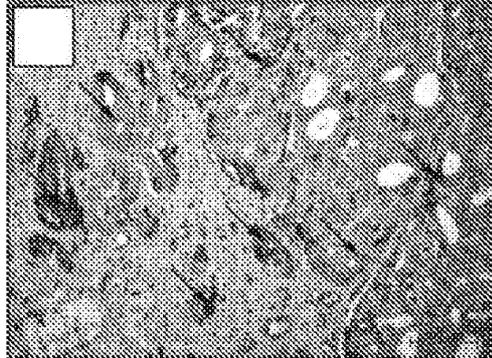


Fig 3b

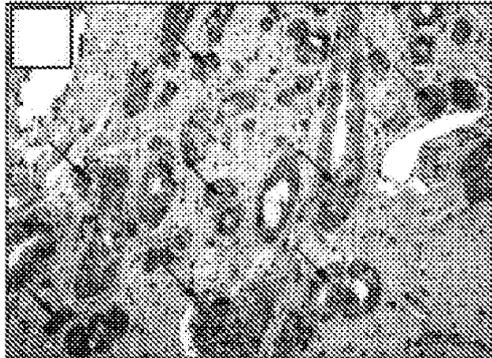


Fig 3c

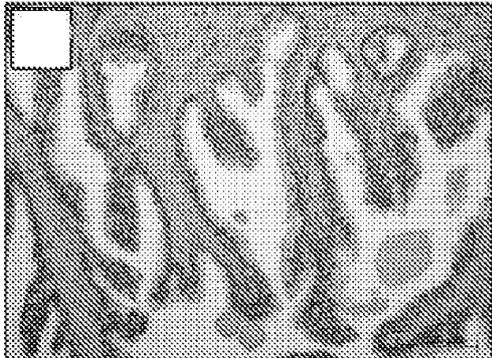
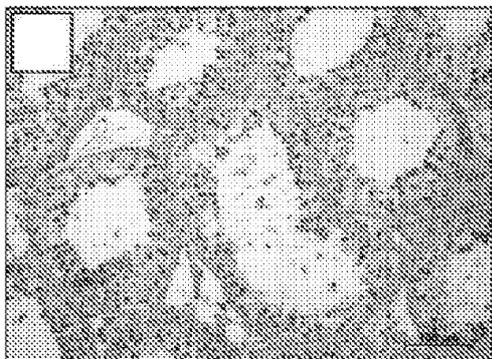


Fig 3d



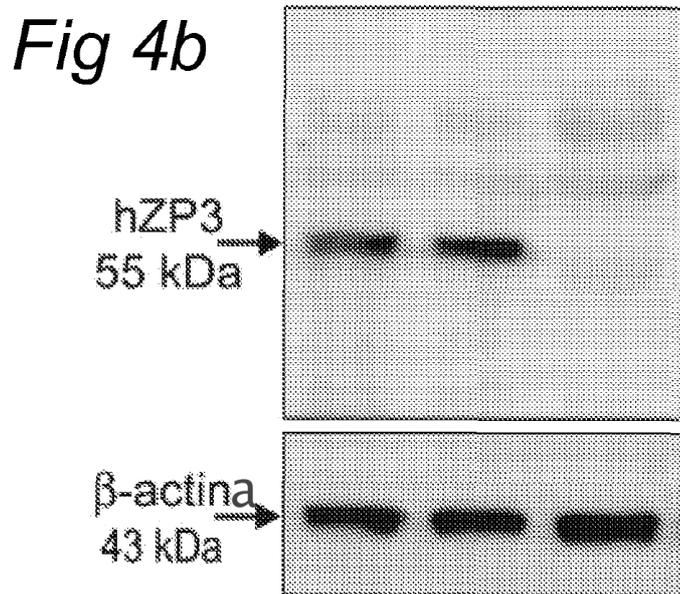
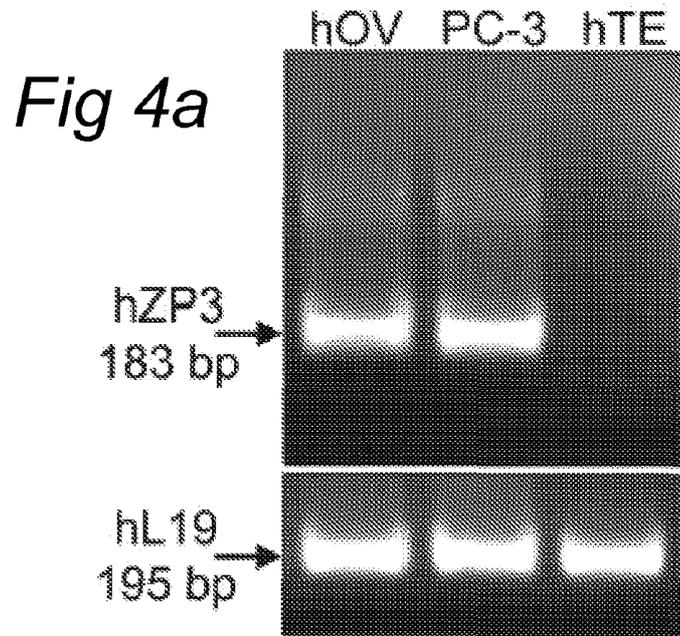


Fig 5a

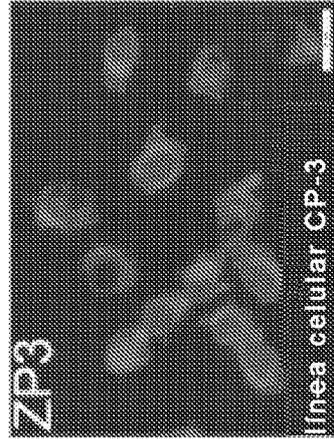


Fig 5b

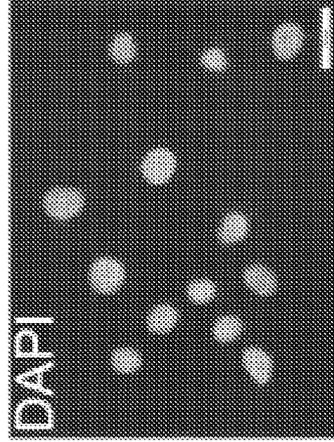


Fig 5c

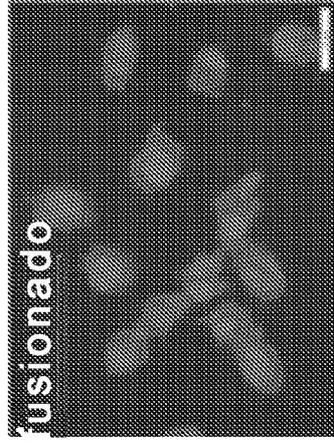


Fig 6

