

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 768**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2012 PCT/IB2012/053396**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2012 E 12780814 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2729166**

54 Título: **Antígeno de cáncer**

30 Prioridad:

**05.07.2011 IN MM19292011**

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

**26.12.2017**

73 Titular/es:

**CADILA PHARMACEUTICALS LIMITED (100.0%)  
"Cadila Corporate Campus" Sarkhej-Dholka Road  
Bhat, Ahmedabad  
382210 Gujarat, IN**

72 Inventor/es:

**MODI, INDRAVADAN AMBALAL;  
KHAMAR, BAKULESH MAFATLAL;  
SHUKLA, CHANDRESHWAR PRASAD;  
THAKKAR, VIPUL SITARAM y  
DESAI, NIRAV MANOJKUMAR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 647 768 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**

Antígeno de cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a antígeno o antígenos de vacunas de cáncer que tienen inmunogenicidad contra cáncer que es específico de tejido/órgano de origen para su uso en el tratamiento del cáncer.

10 Antecedentes

El cáncer está provocado por células que se dividen rápidamente. Es una causa importante de morbilidad y mortalidad. El cáncer surge de un tejido/órgano. A pesar del hecho de que surge de un único tejido/órgano, las células no son idénticas (homólogas). El cáncer se trata por extirpación quirúrgica, radioterapia y/o quimioterapia.

15 También se ha descubierto que la inmunoterapia pasiva en forma de anticuerpos es útil. Se sabe que la presencia de células heterogéneas en un cáncer que surge de un único tejido/órgano es responsable de la mala respuesta a terapias de cáncer distintas de terapia quirúrgica. Estas son más importantes para el tratamiento de los cánceres usando inmunoterapia.

20 Se está probando la inmunoterapia activa en forma de vacuna para el tratamiento del cáncer. La inmunoterapia activa requiere el uso de antígeno específico para el cáncer que se trate. Algunos de los antígenos específicos de cáncer incluyen inhibidores de la metaloproteinasas de la matriz, factor de crecimiento epidérmico, gastrina, células cancerosas completas, Proteínas de Choque Térmico, etc.

25 Se han propuesto varios métodos para producir una vacuna inmunogénica del cáncer usando células completas. La respuesta inmunitaria generada por vacuna del cáncer provoca con frecuencia autoinmunidad o toxicidad (Blood-2011-01-325-266).

30 Existe por tanto la necesidad de tener un antígeno de cáncer que induzca respuesta inmunitaria contra antígenos de cáncer pero no contra células normales (Autoinmunidad). Las células cancerosas cuando se usan como un antígeno carecen de inmunogenicidad o bien generan una respuesta inmunitaria escasa. Se sabe que la antraciclina y el Oxaliplatino mejoran la inmunogenicidad de células cancerosas como se indica en Laurence Zitvogel *et al* en Clin Cancer Res, 2010, 16(12):3100-4. *“En respuesta a algunos agentes quimioterapéuticos (tales como antraciclinas y oxaliplatino) e irradiación ionizante, las células tumorales experimentan apoptosis inmunogénica, lo que significa que desencadenan una respuesta inmunitaria protectora cuando se inyectan por vía subcutánea en ausencia de cualquier adyuvante en ratones inmunocompetentes (J Exp Med 2005; 202: 1691-701; Nat Med 2007; 13: 54-61; Immunol Rev 2007; 220: 22-34; Nat Med 2007; 13: 1050-9; Nat Med 2009; 15: 1170-8; Cell Mol Immunol 2009; 6: 469-75; Cancer Immunol Immunother 2010; 50: 769-77). Por el contrario, las células que sucumben en respuesta a otros fármacos antineoplásicos (tales como agentes alquilantes y cisplatino) no consiguen desencadenar dicha reacción inmunitaria (J Exp Med 2005; 202: 1691-701)”*.

45 El documento WO2011/068832 proporciona métodos para preparar un perfil de expresión génica de una célula de cáncer de mama. Voetzel *et al.* (1994) Hybridoma vol. 13, n.º 5, páginas 367-372 desvela la detección de una sobreexpresión de antígeno de 45 kilodalton en una línea celular de carcinoma ovárico humano resistente a cisplatino. Sheng Pan *et al.* (2009) OMICA: A Journal of Integrative Biology, vol. 13, n.º 4, páginas 345-354 desvela análisis proteómico cuantitativo integrado con datos de micromatrices e indica que esto revela que proteínas de la matriz extracelular, cateninas y proteína de unión a p53 1 son importantes para la respuesta a quimioterapia en cánceres ováricos.

50 El reto es generar la respuesta inmunitaria específica contra células cancerosas sin que sea reactivo para células normales y células cancerosas de diferente tejido/órgano de origen.

55 Existe por lo tanto una necesidad no satisfecha para proporcionar una vacuna de cáncer que tenga inmunogenicidad para la población heterogénea de células que se origina del mismo tejido/órgano sin reactividad con las células normales.

Objeto de la invención:

60 El principal objeto de la presente invención es proporcionar antígeno o antígenos para vacuna o vacunas de cáncer.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un antígeno para una vacuna de cáncer que induzca respuesta inmunitaria contra células cancerosas (células cancerosas homólogas así como heterogéneas) del tejido/órgano de origen.

65

Es otro objeto más proporcionar un antígeno de cáncer para tumor o tumores malignos que estimulen la respuesta inmunitaria mediada por células contra células cancerosas (células cancerosas homólogas así como heterogéneas) del tejido/órgano de origen.

5 Es otro objeto más proporcionar una vacuna de cáncer para tumor o tumores malignos que estimule la respuesta inmunitaria humoral contra células cancerosas (células cancerosas homólogas así como heterogéneas) del tejido/órgano de origen.

10 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un antígeno para vacuna de cáncer para su uso en el tratamiento de tumor o tumores malignos.

#### Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona una proteína aislada expresada por células cancerosas cuando se tratan con un agente seleccionado de *Mycobacterium w*, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina y una combinación de los mismos para su uso en el tratamiento del cáncer, siendo dicha proteína un antígeno de cáncer seleccionado de una proteína de 45 kDa expresada por células de cáncer pancreático y una proteína de 36 kDa expresada por células de melanoma.

20 Pueden aislarse células de cáncer pancreático o de melanoma de tejidos tumorales. Cualquier célula cancerosa pancreática o de melanoma que se origina a partir de líneas celulares establecidas disponibles en el mercado o nuevas células cancerosas primarias obtenidas de pacientes puede tratarse con un agente seleccionado de *Mycobacterium w*, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina y una combinación de los mismos para proporcionar la proteína aislada definida anteriormente para el uso médico de la presente invención.

25 Sorprendentemente las células cancerosas tratadas con cisplatino, paclitaxel, gemcitabina *Mycobacterium w* o una combinación de los mismos muestran un perfil de proteínas alterado. Más sorprendentemente se ha descubierto que los perfiles proteicos de la célula tratada tienen al menos una proteína común (expresada/sobreexpresada habitualmente) independientemente del agente usado para el tratamiento, por ejemplo, *Mycobacterium w*, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina. Esta observación sorprendente es a pesar del hecho que de cada uno tiene diferentes actividades. Se ha descubierto que esta proteína es una proteína expresada de forma diferente después de los tratamientos anteriores.

30 De acuerdo con la presente invención, la proteína es una proteína de 45 kDa expresada por células de cáncer pancreático o una proteína de 36 kDa expresada por células de melanoma.

35 Se ha descubierto que la proteína expresada habitualmente mencionada anteriormente es inmunogénica e induce respuesta inmunitaria reactiva contra células cancerosas de las que deriva (homólogas) así como células cancerosas del mismo tejido/órgano pero con diferentes características celulares (heterólogas).

40 Según la invención cuando una línea celular de cáncer pancreático se trata con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados se produce expresión de una proteína de 45 kDa que induce respuesta inmunitaria contra las mismas células (homólogas) así como células diferentes (heterólogas) siempre que su origen sea del mismo tejido/órgano, por ejemplo, una proteína expresada después del tratamiento de la línea celular Mia-pa-ca-2 inducirá respuesta inmunitaria contra células Mia-pa ca-2 (homólogas) así como Panc-1, AsPc-1, SW 1990, etc. heterólogas. La respuesta inmunitaria generada es mediada por células así como de naturaleza humoral.

La respuesta inmunitaria generada de este modo es capaz de proporcionar efectos profilácticos así como terapéuticos contra cáncer pancreático.

50 La respuesta inmunitaria generada usando una línea celular de cáncer pancreático no consigue generar respuesta inmunitaria contra otro cáncer. Se ha descubierto que la administración de la proteína o las proteínas es segura en mamíferos.

#### Descripción detallada

55 Se ha observado que cuando se tratan células cancerosas con *Mycobacterium w* (*Mw*) existe un cambio en el perfil proteico de células cancerosas. El cambio en el perfil proteico se asocia con abundancia de una única banda proteica como se observa por análisis de SDS Page.

60 Sorprendentemente se ha descubierto que la misma proteína se expresa cuando se tratan las células con cisplatino, paclitaxel, gemcitabina. La proteína que se expresa de este modo se define como proteína expresada/sobreexpresada habitualmente.

65 La proteína expresada de este modo puede aislarse usando métodos conocidos como se describen en Current Protocols in Protein Science por John E. Coligan *et al.*

De acuerdo con la presente invención, debería entenderse que cualquier referencia en el presente documento a la proteína es una referencia a una proteína de 45 kDa expresada por células de cáncer pancreático o una proteína de 36 kDa expresada por células de melanoma.

5 Sorprendentemente se ha descubierto que esta proteína genera respuesta inmunitaria contra células cancerosas homólogas así como heterogéneas específicas para el tejido/órgano de origen. La proteína no genera respuesta inmunitaria contra células/tejidos normales cuando se administra a mamíferos.

10 Sorprendentemente también se ha observado que el tratamiento de células cancerosas con compuestos tales como cisplatino, paclitaxel y gemcitabina también da como resultado la expresión de la proteína que se expresa, cuando las células se tratan con *Mycobacterium w.*

15 Por lo tanto según la presente invención la proteína o las proteínas que se expresan/sobreexpresan habitualmente por tratamiento de células cancerosas con Mw, cisplatino, paclitaxel y gemcitabina o combinación de los mismos generan una respuesta inmunitaria contra células cancerosas homólogas así como heterogéneas, específicas del tejido/órgano de origen.

20 La proteína expresada/sobreexpresada habitualmente que induce la respuesta inmunitaria se aísla de célula o células cancerosas. Para el fin de la presente invención no es necesario que el tratamiento con diversos agentes induzca muerte de células cancerosas. No se requiere que las células estén vivas para aislamiento de la proteína expresada habitualmente.

25 La proteína común de la presente invención también induce la respuesta inmunitaria específica de las células cancerosas heterogéneas específicas del tejido/órgano.

La administración de la proteína común de la presente invención induce una respuesta inmunitaria mediada por células. Los métodos comunes empleados para la medición de la respuesta inmunitaria mediada por células son FACS, ELISPOT y función efectora, etc.

30 La administración de la proteína común de la presente invención induce respuesta inmunitaria humoral. Los métodos habituales empleados para este fin son FACS, transferencia de Western, Elisa, etc.

35 La eficacia del antígeno de cáncer se determina por su capacidad para inducir respuesta inmunitaria contra células cancerosas homólogas así como heterogéneas, específicas para el tejido/órgano de origen.

La eficacia de la vacuna del cáncer para inducir respuesta inmunitaria se estudió determinando la respuesta inmunitaria mediada por células como una medida del aumento del número de células que producen interferón gamma en respuesta a antígeno por ELISPOT.

40 La eficacia de la vacuna del cáncer para inducir respuesta inmunitaria se estudió determinando la respuesta inmunitaria humoral de los sueros de ratones, inmunizados con células que expresan/sobreexpresan el antígeno y ratones inmunizados con el antígeno solo por la presencia de anticuerpo específico reactivo al antígeno.

45 De forma similar, se determinó la respuesta inmunitaria inducida a células cancerosas heterogéneas específicas de tejido/órgano. La respuesta heterogénea se evaluó tanto para respuesta mediada por células usando ELISPOT de interferón gamma como para respuesta humoral usando transferencia de Western.

50 Las líneas celulares para el fin de la invención pueden obtenerse de diversos depósitos como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Estados Unidos; el banco de Células de Australia, Australia; Depósitos de Células Coriell, Nueva Jersey, Estados Unidos; Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Reino Unido; Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Alemania; Colección Japonesa de Recursos Biológicos de Investigación (JCRB), Japón; Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Alemania; banco de Células Coreano, Corea; Centro de Recursos Biológicos RIKEN, Japón; Centro de Recursos Genéticos Humanos, Estados Unidos; Centro Nacional para la Ciencia Celular, India; MMRRC: Centros de Recursos Regionales de Ratones Mutantes, Estados Unidos; Servicio Nacional de Células Madre Neuronales Humanas, Estados Unidos; Banco de Células Madre de Reino Unido, Reino Unido y NCCS en India.

60 Los métodos para recoger células cancerosas y conservarlas o propagarlas se conocen bien. Estos métodos pueden usarse para células autólogas así como alogénicas. Estas o nuevas líneas celulares o células cancerosas específicas pueden aislarse como se describe en Eton O, *et al.* (Clinical cancer research, marzo de 1988, Vol. 4, 619-217). Se recogió tumor nuevo en el momento de la cirugía de laboratorio de sección congelada y se fragmentó por corte. Para maximizar la producción de células tumorales viables para preparación de vacunas, la masa de tumor se disoció usando colagenasa de tipo 1 (2 mg/ml) y DNasa de tipo IV (0,4 mg/ml) Sigma chemical Co. St. Louis, MO; ref. 25. Estas enzimas pueden alterar la inmunogenicidad de la preparación celular resultante. Las células disociadas se lavaron en HBSS y gentamicina y se resuspendieron en volúmenes iguales de HBSS y DMSO

10 % + albúmina de suero humano 4 % helado. Se almacenaron alícuotas que contenían  $1,5-2 \times 10^7$  células tumorales viables en nitrógeno líquido.

5 El siguiente proceso describe un proceso para obtener una proteína seleccionada de la proteína de 45 kDa expresada por células de cáncer pancreático o la proteína de 36 kDa expresada por células de melanoma.

Se suspenden células de cáncer pancreático o melanoma en medio de cultivo celular apropiado como DMEM, EMEM, F12 de Hanks, etc.

- 10 1. A estas se añaden cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, *Mycobacterium w* o una combinación de los mismos.  
 2. Se sabe que todos los agentes destruyen células cancerosas, sin embargo para el fin de la presente invención para obtener proteína expresada habitualmente no es necesario destruir las células cancerosas mediante el tratamiento con cualquiera de o todos los agentes. De forma similar, la destrucción de células no da como resultado pérdida de propiedades de las células cancerosas que expresan "proteína común" de interés ni cambia sus características inmunitarias.  
 15 3. La siguiente tabla proporciona una cantidad preferible de diversos agentes para usar

Sr N.º	Agente	Cantidad preferida
1	Cisplatino	De 0,1 a 100 microgramos/ml
2	Paclitaxel	De 5 a 100 microgramos/ml
3	Gemcitabina	De 10 a 1000 nM
4	<i>Mycobacterium w</i>	1:10 a 1:1000

4. Las células se recogen después del tratamiento anteriormente mencionado.  
 20 5. Se genera un perfil proteico de células recogidas usando métodos conocidos como electroforesis, HPLC, etc.  
 6. La proteína expresada habitualmente se identifica por perfiles proteicos solapantes obtenidos mediante tratamiento usando diversos agentes como se ha mencionado anteriormente.  
 7. La proteína identificada puede obtenerse a gran escala usando métodos de purificación de proteínas.

25 Las células cancerosas obtenidas como anteriormente se trataron con células Mw, en una relación que variaba de 1:10 a 1:1000, preferentemente en 1:100. El tratamiento se llevó a cabo en el medio adecuado preferentemente en medio de soporte de crecimiento sin suero. El tratamiento se realizó a temperaturas que variaron entre 20-40 °C, preferentemente a 37 °C. Las células tratadas se lisaron por uno de los métodos conocidos en la técnica y se realizó SDS-PAGE para obtener un perfil proteómico. El perfil obtenido de este modo se comparó con el perfil proteico de células no tratadas. Se observó el patrón de bandas de proteínas expresadas diferencialmente.

30 Las células cancerosas se trataron con Cisplatino, a una concentración que varió de 0,1 µg/ml a 100 µg/ml, preferentemente a 5 µg/ml. El tratamiento se llevó a cabo en medio adecuado preferentemente en medio de soporte de crecimiento sin suero. El tratamiento se realizó a temperaturas que variaron entre 20 y 40 °C, preferentemente a 37 °C. Las células tratadas se lisaron por uno de los métodos conocidos en la técnica y se realizó SDS-PAGE para obtener el perfil proteómico. El perfil obtenido de este modo se comparó con el perfil proteico de células no tratadas. Se observó el patrón de bandas de proteínas expresadas diferencialmente.

35 Las células cancerosas se trataron con paclitaxel, a una concentración que varió de 5 µg/ml a 500 µg/ml, preferentemente a 5 µg/ml. El tratamiento se llevó a cabo en medio adecuado preferentemente en medio de soporte de crecimiento sin suero. El tratamiento se realizó a temperaturas que variaron entre 20 y 40 °C, preferentemente a 37 °C. Las células tratadas se lisaron por uno de los métodos conocidos en la técnica y se realizó SDS-PAGE para obtener un perfil proteómico. El perfil obtenido de este modo se comparó con el perfil proteico de células no tratadas. Se observó el patrón de bandas de proteínas expresadas diferencialmente.

40 Las células cancerosas se trataron con gemcitabina, a una concentración que varió de 10 nm a 1000 nm, preferentemente a 800. El tratamiento se llevó a cabo en medio adecuado preferentemente en medio de soporte de crecimiento sin suero. El tratamiento se realizó a temperaturas que variaron entre 20 y 40 °C, preferentemente a 37 °C. Las células tratadas se lisaron por uno de los métodos conocidos en la técnica y se realizó SDS-PAGE para obtener un perfil proteómico. El perfil obtenido de este modo se comparó con el perfil proteico de células no tratadas. Se observó el patrón de bandas de proteínas expresadas diferencialmente.

45 Los perfiles proteicos alterados obtenidos para cada uno de los tratamientos anteriores se compararon entre sí. La proteína o las proteínas expresadas/sobreexpresadas habitualmente se observaron/identificaron a entre 40-50 kDa en células cancerosas Mia-pa-ca-2.

50 Las células cancerosas tratadas y no tratadas se resuspendieron en PBS, pH 6,5 a 7,5. Las células se sometieron a ultrasonidos durante 500-1500 segundos programados para 5-15 s de encendido y 5-15 s de apagado, preferentemente se sometieron a ultrasonidos durante 900 segundos programados para 9 s de encendido y 10 s de apagado. Se realizó la estimación de proteína total por método de estimación de proteínas de Lowry para lisado. Se

- calculó la proteína total y se cargaron 20 microgramos de proteína/carril en el gel. Se usó gel de acrilamida 5-20 % para aislamiento de la proteína, preferentemente se usó gel de acrilamida 10 % con tensioactivo tal como, pero sin restricción, SDS. El gel se procesó a una tensión constante de 100 a 300 V, preferentemente 200 V durante 30-90 min, preferentemente 60 min. El gel se tiñó con solución de tinción de Azul de Coomassie R250 durante 15-60 min y se destiñó con solución de destinción (metanol 40 % + ácido acético 10 % + agua 50 %) hasta que el fondo fue transparente y las bandas fueron visibles en gel. El perfil proteico obtenido se comparó banda a banda y se observaron las proteínas expresadas/sobreexpresadas habitualmente por tratamiento con Mw, cisplatino, paclitaxel y gemcitabina.
- Después de la identificación el gel que tenía una banda de interés se cortó en trozos y después se eluyó en tampón de elución (Tris-Cl 20 mM, pH 7,7, NaCl 150 mM, SDS 0,2 %, EDTA 2 mM) y se mantuvo en un agitador para agitación a TA durante un mínimo de 6-8 horas o durante una noche. El sobrenadante se recogió y se añadió acetona helada (proteína:acetona 1:4) y se mantuvo a -20 °C durante 1-2 horas para precipitación. El precipitado se centrifugó a 15000 x g durante 45 min a 4 °C. El sedimento obtenido se lavó con acetona (Acetona; agua, 4:1) y se resuspendió en un volumen deseado de PBS. La proteína total de estimó por ensayo de Lowry y su especificidad se analizó usando suero de ratón interno que contenía anticuerpo contra la proteína de interés. Se realizó una electroforesis en gel bidimensional para identificar esta proteína expresada diferencial. La proteína apareció como un gran punto en el gel a un tamaño de 45 kDa en comparación con un marcador de peso molecular de proteínas convencional procesado en el mismo gel.
- La proteína expresada habitualmente se inyectó en ratones. Se produjo la respuesta inmunitaria específica reactiva con células cancerosas en ratones. Se midió la respuesta inmunitaria humoral detectando anticuerpos específicos para proteína expresada/sobreexpresada habitualmente. El análisis se realizó usando técnicas convencionales para transferencia de Western, transferencia puntual y ELISA.
- La respuesta celular (respuesta inmunitaria mediada por células = CMI) se midió por enumeración de células productoras de interferón gamma y/o granzima, y/o porcentaje de destrucción de células diana (células cancerosas).
- La vacuna preparada según la presente invención cuando se administra a animales portadores de tumores (ratones, mamíferos) da como resultado regresión tumoral si la vacuna y el tumor tienen un mismo tejido de origen, por ejemplo, vacuna de proteína de melanoma para melanoma.
- Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero no limitan de ningún modo el alcance de la invención.
- Ejemplo 1: Método para identificar las proteínas expresadas habitualmente
1. Cáncer pancreático
- Las células Mia-Pa-Ca-2 se trataron con células Mw en una relación 1:500, cisplatino a 5 µg/ml, paclitaxel a 150 µg/ml y gemcitabina a 800 nm. El tratamiento se llevó a cabo en medio sin suero a 37 °C. Las células se lisaron y se realizó SDS-PAGE para obtener un perfil proteómico. Los perfiles obtenidos de este modo se solaparon con el perfil proteico de células no tratadas. El perfil proteico se observó para cada tratamiento. La proteína expresada diferencialmente se identificó a 45 kDa.
- La proteína de 45 kDa es una proteína sobreexpresada habitualmente cuando se tratan células de cáncer pancreático con Mw, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina o una combinación de los mismos.
2. Melanoma (cáncer de piel)
- Las células de melanoma B16 se trataron con cisplatino a 5 µg/ml, paclitaxel a 150 µg/ml y gemcitabina a 800 nm. El tratamiento se llevó a cabo en medio sin suero a 37 °C. Las células se lisaron y se procesó SDS-PAGE para obtener un perfil proteómico. Los perfiles obtenidos de este modo se solaparon con el perfil proteico de células no tratadas. El perfil proteico se observó para cada tratamiento. La proteína expresada diferencialmente se identificó a 36 kDa. La proteína de 36 kDa es una proteína expresada habitualmente cuando se tratan células de melanoma con cisplatino, paclitaxel, gemcitabina o combinación de los mismos.
3. Cáncer de pulmón
- Se trataron diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón (A549 y L132) con Mw/células a una relación de 1:100. Cada grupo de tratamiento contenía 4 x 10<sup>6</sup> células. Las células tratadas con Mw se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Después del tratamiento, las células se sedimentaron y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron después en DBPS (400 µl). Las células se sometieron después a ultrasonidos durante 15 minutos con pulsos de 10 segundos de encendido y 20 segundos de apagado. Se estimó el contenido proteico del lisado obtenido usando ensayo de Proteínas BCA y la proteína se normalizó a una carga de 30 µg de proteína en cada pocillo. Esto se siguió de análisis de SDS PAGE reductor 12 % y transferencia de Western para obtener un perfil

proteico y una respuesta humoral. El perfil obtenido de este modo se comparó con el perfil proteico de células no tratadas. Ambas líneas celulares mostraron una proteína común a 43 kDa.

#### 4. Melanoma cutáneo

Se trataron diferentes líneas celulares de cáncer de melanoma cutáneo (A375, B16F1 y B16F10) con Mw/células a una relación de 1:100. Cada grupo de tratamiento contenía  $4 \times 10^6$  células. Las células tratadas con Mw se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Después del tratamiento, las células se sedimentaron y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron después en DBPS (400 µl). Las células se sometieron después a ultrasonidos durante 15 minutos con pulsos de 10 segundos de encendido y 20 segundos de apagado. Se estimó el contenido proteico del lisado obtenido usando ensayo de Proteínas BCA y la proteína se normalizó a una carga de 30 µg de proteína en cada pocillo. Esto se siguió de análisis de SDS PAGE reductor 12 % y transferencia de Western para obtener un perfil proteico y una respuesta humoral. El perfil obtenido de este modo se comparó con el perfil proteico de células no tratadas.

Los geles mostraron dos proteínas, una a 36 kDa y una segunda a 170 kDa. Resulta interesante que ambas proteínas tenían reactividad cruzada entre A375, B16F1 y B16F10 cuando se transfirieron con anticuerpo inducido con células B16 tratadas mientras que los anticuerpos inducidos con células A375 tratadas solamente eran reactivos con proteína de 36 kDa.

#### 5. Cáncer de colon

Se trataron diferentes líneas celulares de cáncer de colon (HCT15 y Colo205) con Mw/células a una relación de 1:100. Cada grupo de tratamiento contenía  $4 \times 10^6$  células. Las células tratadas con Mw se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Después del tratamiento, las células se sedimentaron y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron después en DBPS (400 µl). Las células se sometieron después a ultrasonidos durante 15 minutos con pulsos de 10 segundos de encendido y 20 segundos de apagado. Se estimó el contenido proteico del lisado obtenido usando ensayo de Proteínas BCA y la proteína se normalizó a una carga de 30 µg de proteína en cada pocillo. Esto se siguió de análisis de SDS PAGE reductor 12 % y transferencia de Western para obtener un perfil proteico y una respuesta humoral. El perfil obtenido de este modo se comparó con el perfil proteico de células no tratadas. Ambas líneas celulares mostraron una proteína común entre 10-15 kDa y 26 kDa.

Ejemplo 2: Método para aislamiento de proteína expresada/sobreexpresada habitualmente (antígeno de cáncer):

Se recogió sedimento celular de Mia-pa ca-2 y se lavó con DPBS estéril por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Las células se trataron como en el ejemplo 1 y 2. El sedimento de células tratadas se resuspendió en DPBS y se sometió a ultrasonidos durante 15 minutos. El contenido proteico total del lisado se estimó mediante el método de Folin Lowry. Se cargaron 20 µg de lisado en cada carril de SDS PAGE 10 % y se procesó durante 45 minutos a 200 V. El gel se tiñó con Azul Brillante de Coomassie R250. Se observó una banda a 45 kDa en relación con el marcador proteico de peso molecular y se cortó. El trozo cortado se picó finamente y se incubó en tampón de lisis (Tris-Cl 20 mM, pH 7,7, NaCl 150 mM, SDS 0,2 %, EDTA 2 mM) con agitación a temperatura ambiente durante una noche. La proteína se eluyó del gel centrifugando el lisado a 15000 x g durante 45 minutos a 4 °C. El sobrenadante se mezcló con acetona helada a relaciones 1:4 y se incubó a -20 °C durante aproximadamente 1 hora. El precipitado obtenido se separó centrifugándolo a 15000\*g durante 45 minutos a 4 °C. El sedimento se lavó con solución de acetona:agua 3:2 y se centrifugó a 15000\*g durante 45 minutos a 4 °C. El sedimento obtenido se resuspendió en DPBS y se estimó su contenido proteico mediante el método de Folin Lowry. Se obtuvo aproximadamente el 90 % de proteína purificada.

Ejemplo 3: Formulación farmacéutica

La formulación farmacéutica de la proteína expresada habitualmente para cáncer pancreático y cáncer de melanoma se prepara de la siguiente manera.

1. Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 10 µg

Tampón de fosfato	50 mM
NaCl	150 mM
Excipiente	qs.

2. Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 50 µg

Tampón de fosfato	50 mM
NaCl	150 mM
Excipiente	qs.

	3.	Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 100 µg	
		Tampón de fosfato	50 mM
		NaCl	150 mM
5		Excipiente	qs.
	4.	Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 10 µg	
		Tampón de acetato	50 mM
10		NaCl	150 mM
		Excipiente	qs.
	5.	Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 50 µg	
15		Tampón de acetato	50 mM
		NaCl	150 mM
		Excipiente	qs.
	6.	Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 100 µg	
20		Tampón de acetato	50 mM
		NaCl	150 mM
		Excipiente	qs.
	7.	Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 100 µg	
25		Tampón de fosfato	10 mM
		NaCl	300 mM
		Excipiente	qs.
30			
	8.	Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 1 µg	
		Tampón de fosfato	10 mM
35		NaCl	300 mM
		Excipiente	qs.
	9.	Proteína de 36 kDa de células cancerosas de melanoma – 10 µg	
40		Tampón de fosfato	50 mM
		NaCl	150 mM
		Excipiente	qs.
	10.	Proteína de 36 kDa de células cancerosas de melanoma – 100 µg	
45		Tampón de fosfato	50 mM
		NaCl	150 mM
		Excipiente	qs.
	11.	Proteína de 36 kDa de células cancerosas de melanoma – 500 µg	
50		Tampón de fosfato	50 mM
		NaCl	150 mM
		Excipiente	qs.
	12.	Proteína de 36 kDa de células cancerosas de melanoma – 1 µg	
55		Tampón de acetato	50 mM
		NaCl	150 mM
		Excipiente	qs.
60			
	13.	Proteína de 36 kDa de células cancerosas de melanoma – 500 µg	
		Tampón de acetato	50 mM
65		NaCl	150 mM
		Excipiente	qs.

14. Proteína de 36 kDa de células cancerosas de melanoma – 50 µg

	Tampón de fosfato	10 mM
	NaCl	300 mM
5	Excipiente	qs.

15. Proteína de 45 kDa de células de cáncer pancreático – 500 µg

	Tampón de Tris	50 mM
10	Excipiente	qs.

16. Proteína de 36 kDa de células cancerosas de melanoma – 500 µg

	Tampón de Tris	50 mM
15	Excipiente	qs.

La formulación anterior se usa sola o en combinación opcionalmente con adyuvante para inducir una respuesta inmunitaria deseada por administración apropiada.

20 Ejemplo 4: Inducción de respuesta inmunitaria mediada por células por el antígeno de cáncer expresado/sobreexpresado habitualmente: inmunogenicidad de antígeno de cáncer.

25 La respuesta inmunológica a la proteína de 45 kDa (expresada/sobreexpresada habitualmente) se evaluó inmunizando ratones por vía intradérmica el día 0 y 21 con la formulación 1 del ejemplo 3, 10 µg de proteína de 45 kDa. Los ratones de control recibieron PBS. La suspensión de esplenocitos ( $10^7$  células/ml) de ratones individuales se preparó el día 28 del estudio para estimar las células secretoras de IFN-g por ELISPOT. Se realizó ensayo de ELISPOT de esplenocitos de grupos tanto de control como de ensayo.

30 La imagen de la placa se capturó en el Lector de Puntos CTL. Los puntos en cada pocillo se autocontaron. Se realizó QC de placas usando los parámetros de sensibilidad y fondo y se analizaron los resultados. Se halló una liberación de IFN-g dos veces mayor en respuesta a inmunización de proteína de 45 kDa como se muestra en la Fig. 1.

35 Ejemplo 5: Inducción de respuesta inmunitaria humoral por el antígeno de cáncer expresado/sobreexpresado habitualmente: inmunogenicidad de antígeno de cáncer.

40 a. Se evaluó la generación de inmunidad humoral contra el antígeno de cáncer. Los ratones se seleccionaron aleatoriamente en dos grupos. El primer grupo de ratones se inmunizó por vía intradérmica el día 0 y 21 con la formulación 15 del ejemplo 3, mientras que el segundo grupo, es decir, el grupo de control se mantuvo inmunizado con PBS. Se aislaron muestras de suero de todos los ratones el día 28 del estudio para detectar la generación de anticuerpo contra la vacuna. Se realizó transferencia de Western del lisado de MiaPaCa-2 con suero de ratones inmunizados con células cancerosas MiaPaCa-2 tratadas que expresaban proteína de 45 kDa y PBS (control). Para la detección de anticuerpo primario unido con proteína de lisado, se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP con DAB (Diamino Benzidina) como agente colorante. A partir del análisis de transferencia de Western se descubrió que la inmunización con vacuna de cáncer MiaPaCa-2 genera respuesta de anticuerpos contra antígeno de cáncer (Fig. 2).

50 b. Para generar altos títulos de anticuerpos en conejo se co-administró el antígeno de la formulación de cáncer melanoma 10 del ejemplo 3 (36 kDa) con adyuvante de Freund el día 0, 7 y 14. Se tomaron muestras sanguíneas de los conejos inmunizados el día 21 y se midieron los títulos de anticuerpos por ensayo de transferencia puntual recubriendo la membrana de nitrocelulosa con el antígeno y usando sueros de conejos inmunizados como anticuerpo primario. Las transferencias se revelaron mediante conjugado de anticuerpo secundario – HRPO. Se descubrió que los títulos eran más de 10000 para anti-antígeno de melanoma.

55 c. Para generar un anticuerpo anti-antígeno de cáncer pancreático, los conejos se inmunizaron con formulación de antígeno de cáncer pancreático 8 del ejemplo 3 (proteína de ~45 kDa) con adyuvante completo de Freund y el día 15 con adyuvante incompleto de Freund. Se tomaron muestras sanguíneas de los conejos inmunizados el día 30 y se midieron los títulos de anticuerpos por ensayo de transferencia puntual recubriendo la membrana de nitrocelulosa con el antígeno y usando sueros de conejos inmunizados como anticuerpo primario. Las transferencias se revelaron mediante conjugado de anticuerpo secundario – HRPO. Se descubrió que los títulos eran más de 50000 para anti-antígeno de cáncer pancreático.

Ejemplo 6: Destrucción *in vitro* de células cancerosas heterogéneas y homogéneas esplenocitos de ratones inmunizados: Ensayo de función efectora.

A. Respuesta inmunitaria contra células cancerosas homólogas

Se usaron 20 ratones Balb/C macho (6-8 semanas) para el estudio. Los animales se seleccionaron aleatoriamente basándose en el peso corporal y se dividieron en 2 grupos de 10 animales cada uno. El primer grupo de ratones se inmunizó por vía intradérmica el día 0 y 21 con la formulación de antígeno de cáncer 7 del ejemplo 3, 100 µg/ratón/dosis (proteína habitualmente expresada de 45 kDa aislada de células Mia-pa-ca-2 tratadas como se describe en el ejemplo 1) mientras que el segundo grupo, es decir, los ratones de control, se mantuvieron inmunizados con PBS.

Se distribuyeron esplenocitos de animales inmunizados de grupos respectivos en tubos de polipropileno que contenían las células MiaPaCa-2 como diana. Se añadieron efectores de esplenocitos para obtener una relación de efector con respecto a diana de 5:1 y 1:1 respectivamente. Los tubos se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> 6 % durante 4 h. Después de 4 h las células se sedimentaron por centrifugación a 300 x g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se fijó en solución de p-formaldehído 1 % (p/v) y después se lavaron dos veces con DPBS por centrifugación. Se añadió etanol helado al 70 % y se permitió que las células reposaran en hielo durante 30 min. Las células se almacenaron a -20 °C hasta su análisis posterior.

La actividad citolítica de linfocitos T se evaluó determinando la muerte de células diana por células efectoras usando el protocolo del Kit APO BrdU BD. El kit APO-BRDU es un método de tinción de dos colores para marcar roturas de ADN y ADN celular total para detectar células apoptóticas por citometría de flujo. Los ratones inmunizados por antígeno de cáncer (proteína expresada habitualmente de 45 kDa) muestran lisados significativamente mayores de células diana homólogas (células cancerosas Mia-pa-ca-2) en comparación con el grupo de control a relaciones de 5:1 (efector:diana).

B. Respuesta inmunitaria contra células cancerosas heterogéneas (heterólogas)

Se usaron 20 ratones Balb/C macho (6-8 semanas) para el estudio. Los animales se seleccionaron aleatoriamente basándose en el peso corporal y se dividieron en 2 grupos de 10 animales cada uno. El primer grupo de ratones se inmunizó por vía intradérmica el día 0 y 21 con la formulación de antígeno de cáncer 5 del ejemplo 3, 50 µg/ratón/dosis (proteína habitualmente expresada de 45 kDa aislada de células Mia-pa-ca-2 tratadas como se describe en el ejemplo 1) mientras que el segundo grupo, es decir, los ratones de control, se mantuvieron inmunizados con PBS.

Se distribuyeron esplenocitos de animales inmunizados de grupos respectivos en tubos de polipropileno que contenían las células Panc-1, AsPC-1 o SW1990 como diana. Se añadieron efectores de esplenocitos para obtener una relación de efector con respecto a diana de 5:1 y 1:1 respectivamente. Los tubos se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> 6 % durante 4 h. Después de 4 h las células se sedimentaron por centrifugación a 300 x g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento se fijó en solución de p-formaldehído al 1 % (p/v) y después se lavó dos veces con DPBS por centrifugación. Se añadió etanol helado al 70 % y se permitió que las células reposaran en hielo durante 30 min. Las células se almacenaron a -20 °C hasta su análisis posterior.

La actividad citolítica de linfocitos T se evaluó determinando la muerte de células diana por células efectoras usando el protocolo del Kit APO BrdU BD. El kit APO-BRDU es un método de tinción de dos colores para marcar roturas de ADN y ADN celular total para detectar células apoptóticas por citometría de flujo. Los ratones inmunizados por antígeno de cáncer (proteína expresada habitualmente de 45 kDa) muestran lisados significativamente mayores de células de cáncer pancreático diana heterólogas (Panc-1, AsPC-1 o SW1990) en comparación con un grupo de control a relaciones de 5:1 (efector:diana).

Ejemplo 7: Regresión tumoral *in vivo* en ensayo funcional de ratones

1. Se usaron 30 ratones Balb/C macho (6-8 semanas) para el estudio. Los animales se seleccionaron aleatoriamente basándose en el peso corporal. Se realizó la inducción tumoral inyectando  $1 \times 10^5$  células B16-F1 en las extremidades posteriores de los ratones por vía subcutánea. Se permitió que los ratones desarrollaran un tamaño tumoral promedio de  $\sim 100$ - $150 \text{ mm}^3$  y se seleccionaron aleatoriamente en 2 grupos de 10 ratones cada uno basándose en el tamaño tumoral. El primer grupo de ratones se inmunizó por vía intradérmica con la formulación de vacuna de melanoma 13 del ejemplo 3, 500 µg/ratón/dosis (proteína expresada habitualmente de 36 kDa) el día 0 y 10 después de la selección aleatoria mientras que el segundo grupo, es decir, los ratones de control, se mantuvieron sin inmunizar. Se registró el crecimiento del tamaño tumoral dos veces por semana hasta que el tamaño tumoral alcanzó el 10 % del peso corporal del animal.

El volumen tumoral en el grupo de tratamiento no aumentó en comparación con el grupo no tratado (Fig. 3). El grupo de tratamiento de hecho mostró reducción de tamaño tumoral lo que indica la resolución de la condición de enfermedad. En general se mejoró la supervivencia y se redujo el tamaño tumoral en ratones en el grupo de tratamiento.

5 2. Se usaron 20 ratones C57 macho (6-8 semanas) para el estudio. Los animales se seleccionaron aleatoriamente basándose en el peso corporal. Se realizó la inducción tumoral inyectando  $1 \times 10^5$  células Pan 02 (línea celular de cáncer pancreático) en las extremidades posteriores de los ratones por vía subcutánea. Se permitió que los ratones desarrollaran un tamaño tumoral promedio de  $\sim 200 \text{ mm}^3$  y se seleccionaron aleatoriamente en 2 grupos de 10 ratones cada uno basándose en el tamaño del tumoral. El primer grupo de ratones se inmunizó por vía intradérmica con formulación de vacuna de cáncer pancreático 4 del ejemplo 3, 10  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{dosis}$  (proteína expresada habitualmente de 45 kDa) el día 0 y 10 después de la selección aleatoria mientras que el segundo grupo, es decir, ratones de control, se mantuvo sin inmunizar (sin tratamiento). Se registró el tamaño tumoral dos veces por semana hasta que el tamaño tumoral alcanzó el 10 % del peso corporal del animal.

El volumen tumoral en el grupo de tratamiento no aumentó en comparación con el grupo no tratado. En general se mejoró la supervivencia y se redujo el tamaño tumoral en ratones en el grupo de tratamiento. El grupo de tratamiento mostró progresión retardada de la masa tumoral en comparación con animales sin tratamiento.

20 3. Se usaron 10 ratones C57 macho (6-8 semanas) para el estudio. Los animales se seleccionaron aleatoriamente basándose en el peso corporal. El primer grupo de ratones se inmunizó por vía intradérmica con formulación de vacuna de cáncer pancreático 15 del ejemplo 3, 500  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{dosis}$  (proteína expresada habitualmente de 45 kDa) el día 0 y 10 después de la selección aleatoria mientras que el segundo grupo, es decir, ratones de control, se mantuvo sin inmunizar (sin tratamiento). Se realizó la inducción tumoral inyectando  $1 \times 10^5$  células Pan 02 (línea celular de cáncer pancreático) en las extremidades posteriores de los ratones por vía subcutánea el día 10 después de la 1ª inyección de vacuna de cáncer pancreático.

Se registró el tamaño tumoral dos veces por semana hasta que el tamaño tumoral alcanzó el 10 % del peso corporal del animal.

El volumen tumoral en el grupo de tratamiento no aumentó en comparación con el grupo no tratado. En general la supervivencia fue mayor en el grupo tratado. El grupo de tratamiento mostró desarrollo retardado del tumor en comparación con animales sin tratamiento.

35 Ejemplo 8: La respuesta inmunitaria generada por proteína expresada/sobreexpresada habitualmente es específica para el tejido/órgano canceroso de origen.

Los ratones se inmunizaron por vía intradérmica el día 0 y 21 con la formulación de antígeno de cáncer 5 del ejemplo 3, 50  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{dosis}$  (proteína expresada habitualmente de 45 kDa). Se aislaron muestras de suero de ratones el día 28 del estudio. Se realizó transferencia de Western con lisados de MiaPaCa-2, AsPC-1, SW-1990 y cánceres de origen diferente como HEK-293 (riñón), PC-3 (Próstata), MCF-7 (Mama), A549 (Pulmón), PA-1 (Ovario) con anticuerpo primario generado en el ratón contra vacuna de cáncer terapéutico. Para detección de anticuerpo primario unido con antígeno o antígenos de lisado, se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP con DAB (Diamino Benzidina) como agente de detección/colorante. El análisis de transferencia de Western muestra (Figura 4) que el anticuerpo generado por inmunización de (proteína expresada habitualmente de 45 kDa) tiene reactividad heterogénea con lisados de células cancerosas de origen pancreático (heterogéneas) mientras que no es reactivo con lisados de células cancerosas de diferente tejido/órgano. En el Gel 1 de la Figura 4 los carriles 2 a 4 son de células de cáncer pancreático de diferentes tipos que muestran reactividad con el suero de ratones inmunizados con antígeno de cáncer (proteína expresada habitualmente de 45 kDa) lo que indica reactividad heterogénea a células cancerosas del tejido/órgano de origen. Mientras tanto en el Gel 2 los carriles 1 a 5 no muestran reactividad con células cancerosas de diferente origen tisular, concretamente Próstata, Mama, Pulmón, Ovario y Piel lo que ilustra la seguridad de la vacuna que contiene antígeno de cáncer (proteína expresada habitualmente).

55 Sumario

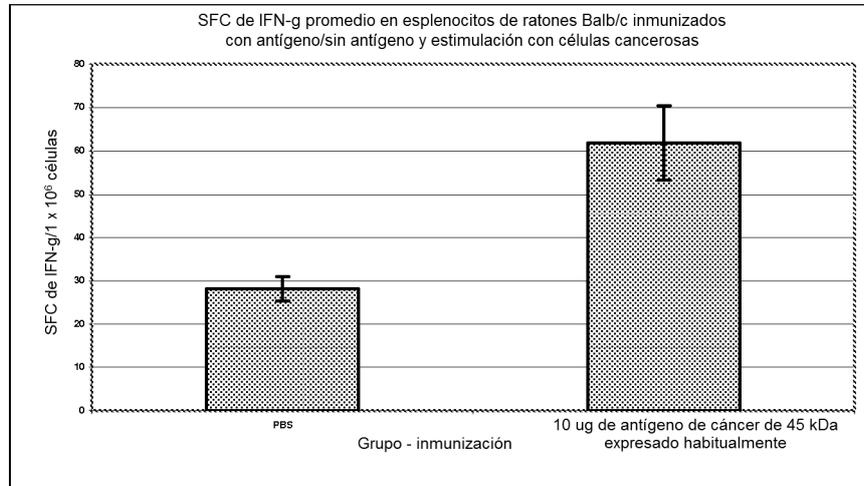
La presente invención ha descubierto sorprendentemente que las células cancerosas tratadas con cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, *Mycobacterium w* o combinación de los mismos muestran un perfil proteico alterado. Además se ha descubierto que los perfiles proteicos de las células tratadas tienen al menos una proteína común (expresada/sobreexpresada habitualmente) independientemente del agente usado para el tratamiento, por ejemplo, *Mycobacterium w*, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina. La proteína (expresada/sobreexpresada habitualmente) es diferente para células cancerosas que se originan de diferente órgano/tejido.

De acuerdo con la presente invención, la proteína es una proteína de 45 kDa expresada por células de cáncer pancreático o una proteína de 36 kDa expresada por células de melanoma.

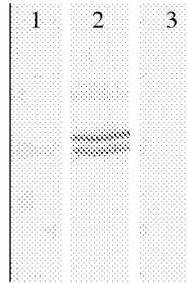
- Se ha descubierto que la proteína expresada habitualmente como se formula en una cantidad de más de 1 µg es inmunogénica e induce respuesta inmunitaria reactiva contra células cancerosas de las que deriva (homólogas) así como células cancerosas del mismo tejido/órgano pero con diferentes características celulares (heterólogas) como se ha descrito en el ejemplo anterior. La respuesta inmunitaria generada usando la línea celular de cáncer pancreático no consigue generar una respuesta inmunitaria contra otro cáncer. Se ha descubierto que la administración de la proteína o las proteínas es segura en mamíferos. Opcionalmente para obtener una respuesta inmunitaria mejorada adicionalmente estas proteínas pueden combinarse con adyuvante antes de la administración a un mamífero.
- 5
- 10 La respuesta inmunitaria generada de este modo es capaz de proporcionar efectos profilácticos así como terapéuticos contra el cáncer pancreático.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína aislada expresada por células cancerosas cuando se tratan con un agente seleccionado de *Mycobacterium w*, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina y una combinación de los mismos para uso en el tratamiento de cáncer,  
en la que dicha proteína es un antígeno de cáncer seleccionado de una proteína de 45 kDa expresada por células de cáncer pancreático y una proteína de 36 kDa expresada por células de melanoma.
- 10 2. La proteína aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proteína induce una respuesta inmunitaria contra células cancerosas homólogas así como heterogéneas del tejido/órgano del que deriva.
- 15 3. La proteína aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la respuesta inmunitaria inducida es una respuesta inmunitaria mediada por células.
- 20 4. La proteína aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la respuesta inmunitaria inducida es una respuesta inmunitaria humoral.
5. La proteína aislada para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha proteína provoca regresión de la carga tumoral cuando se administra a un mamífero en una composición farmacéuticamente aceptable.
6. La proteína aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha composición farmacéuticamente aceptable comprende además un adyuvante.



**Fig 1: Inducción de respuesta inmunitaria mediada por células por el antígeno de cáncer expresado/sobreexpresado habitualmente**



**Patrón de carga**

Carril 1: Marcador de peso molecular preteñido

Carril 2: Suero de ratones inmunizados con células Mia-pa-ca 2 tratadas que expresan proteína de 45 KDa como anticuerpo primario

Carril 3: Suero de ratones normales como anticuerpo primario

**Fig 2: Inducción de respuesta inmunitaria humoral por el antígeno de cáncer expresado/sobreexpresado habitualmente**

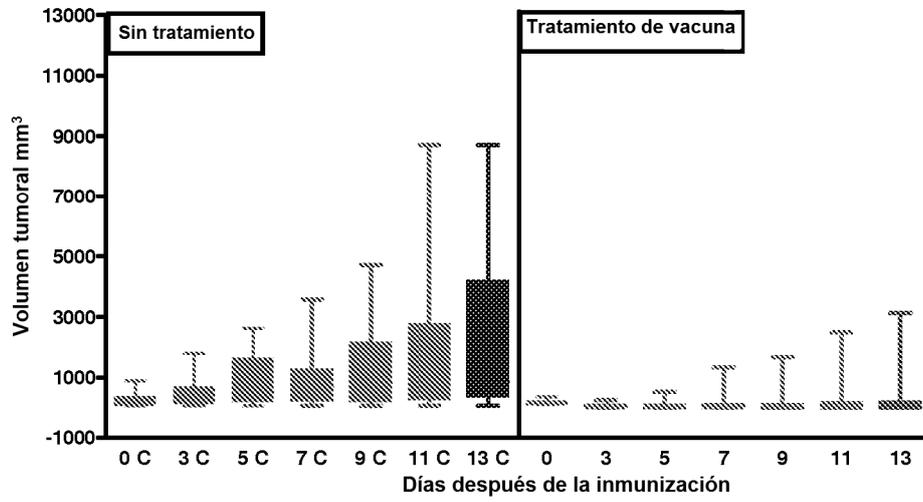
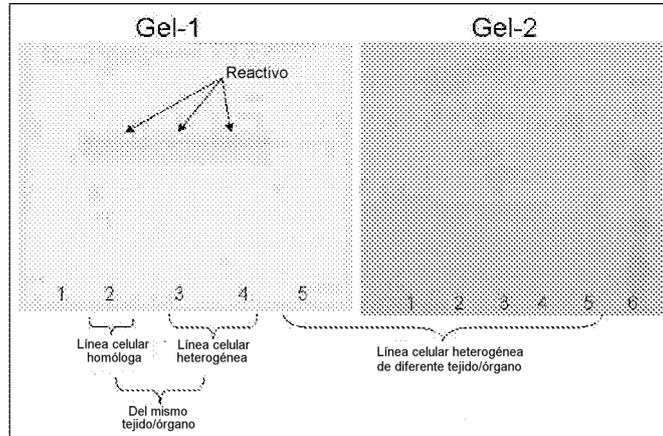


Figura 3: Comparación entre el grupo sin tratamiento y el grupo de tratamiento de vacuna



**Patrón de carga Gel-1**

- Carril 1: blanco
- Carril 2: lisado de células MiaPaCa-2
- Carril 3: lisado de células SW-1990
- Carril 4: lisado de células AsPC-1
- Carril 5: lisado de células HEK 293

**Patrón de carga Gel-2**

- Carril 1: lisado de células PC-3 (cáncer de próstata)
- Carril 2: lisado de células MCF-7 (cáncer de mama)
- Carril 3: lisado de células A549 (cáncer de pulmón)
- Carril 4: lisado de células PA-1 (cáncer ovárico)
- Carril 5: lisado de células A375 (melanoma)
- Carril 6: marcador de proteínas no teñido

**Figura 4: La respuesta inmunitaria generada por proteína expresada/sobreexpresada habitualmente es específica del tejido/órgano canceroso de origen.**