

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 319**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 47/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2003 E 13160214 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2630969**

54 Título: **Vacunas basadas en levadura como inmunoterapia**

30 Prioridad:

16.12.2002 US 434163 P

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

13.06.2018

73 Titular/es:

**GLOBEIMMUNE, INC. (100.0%)
1450 Infinite Drive
Louisville, CO 80027, US**

72 Inventor/es:

**FRANZUSOFF, ALEX y
BELLGRAU, DONALD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 672 319 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

Vacunas basadas en levadura como inmunoterapia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, al uso de vacunas basadas en levadura que comprenden antígenos heterólogos para la provocación de inmunidad humoral y celular y, en un aspecto, para la prevención y el tratamiento de una diversidad de cánceres en un animal.

10

Antecedentes de la invención

La neoplasia, o un proceso de proliferación celular rápida que da como resultado un crecimiento nuevo y anormal, es una característica de muchas enfermedades que pueden ser graves y, a veces, mortales. Normalmente, el crecimiento neoplásico de células y tejidos se caracteriza por una proliferación de células mayor que la normal, en la que las células continúan creciendo incluso después de que el factor instigador (por ejemplo, promotor tumoral, carcinógeno, virus) ya no esté presente. El crecimiento celular tiende a mostrar una falta de organización estructural y/o coordinación con el tejido normal y generalmente crea una masa de tejido (por ejemplo, un tumor) que puede ser benigna o maligna. El crecimiento celular maligno, o tumores malignos, son una de las principales causas de muerte en todo el mundo y el desarrollo de una terapia eficaz para las enfermedades neoplásicas es el tema de un gran número de investigaciones. Aunque se ha propuesto una variedad de enfoques innovadores para tratar y prevenir cánceres, muchos cánceres continúan teniendo una alta tasa de mortalidad y pueden ser difíciles de tratar o relativamente insensibles a las terapias convencionales.

15

20

25

30

Por ejemplo, el cáncer de pulmón es la segunda forma más común de cáncer en los Estados Unidos. Representa el 15% de todos los cánceres y el 28% de todas las muertes por cáncer. En 2002 se diagnosticarán 177.000 nuevos casos estimados y 166.000 morirán, una tasa de mortalidad más alta que la combinada colorrectal, prostática y de mama. El 80% de los tumores primarios de pulmón son carcinomas de pulmón no microcíticos (NSCLC). La quimioterapia convencional continúa siendo relativamente ineficaz, proporcionando la terapia farmacológica múltiple una ventaja mínima de supervivencia con toxicidad significativa.

35

40

Como otro ejemplo, el *glioblastoma multiforme* (glioma) es el tumor cerebral maligno primario más común en adultos. A pesar del uso de cirugía, radioterapia y quimioterapia, las tasas de curación y la mediana de supervivencia de los pacientes no han mejorado. Otros tumores también hacen metástasis en el cerebro y, en este contexto, responden peor a la quimioterapia periférica debido a las limitaciones impuestas por la barrera hematoencefálica a la administración de fármacos. Claramente, se necesitan más enfoques terapéuticos dirigidos a tumores cerebrales. Uno de estos enfoques implica inmunoterapia. Se sabe desde hace tiempo que los linfocitos cebados en la periferia pueden atravesar la barrera hematoencefálica y dirigirse al tejido cerebral. Los objetivos principales para la inmunoterapia contra tumores cerebrales son las vacunas que provocan respuestas inmunitarias contra antígenos nuevos o mutados expresados específicamente en células tumorales cerebrales. El objetivo, por lo tanto, es proporcionar un enfoque de vacuna que proporcione una protección inmunitaria amplia, vigorosa y duradera contra los tumores intracraneales.

45

50

55

60

Las vacunas se utilizan ampliamente para prevenir enfermedades y tratar enfermedades establecidas (vacunas inmunoterapéuticas). Los antígenos proteicos (por ejemplo, vacunas de subunidad, cuyo desarrollo se hizo posible mediante tecnología de ADN recombinante), cuando se administran sin adyuvantes, inducen inmunidad humoral (anticuerpo) débil y, por lo tanto, han sido desalentadores hasta la fecha ya que solamente generan inmunogenicidad limitada. Una desventaja adicional de las vacunas de subunidad, así como de las vacunas de virus muertos y de virus vivos recombinantes, es que, si bien parecen estimular una respuesta inmunitaria humoral fuerte cuando se administran con adyuvantes, no logran provocar inmunidad celular protectora. Los adyuvantes se usan experimentalmente para estimular respuestas inmunitarias potentes en ratones y son deseables para su uso en vacunas humanas, pero pocos están aprobados para uso humano. De hecho, los únicos adyuvantes aprobados para su uso en los Estados Unidos son las sales de aluminio, el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio, ninguno de los cuales estimula la inmunidad mediada por células. Las formulaciones de sal de aluminio no se pueden congelar o liofilizar y tales adyuvantes no son efectivos con todos los antígenos. Además, la mayoría de los adyuvantes no conducen a la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL). Se necesitan CTL para matar células que están sintetizando proteínas aberrantes, incluidas proteínas víricas y proteínas "propias" mutadas. Las vacunas que estimulan CTL se están estudiando intensamente para su uso contra una variedad de enfermedades, incluyendo todos los cánceres (por ejemplo, melanoma, próstata, ovárico, etc.). Por lo tanto, se necesitan adyuvantes que estimulen CTL y la inmunidad mediada por células en general.

65

Las levaduras se han utilizado en la producción de vacunas de proteínas de subunidad; sin embargo, en este caso, las levaduras se usan para producir la proteína, pero las células de levadura o las fracciones subcelulares de las mismas no se administran realmente al paciente. También se han suministrado levaduras a animales antes de la inmunización para tratar de cebar la respuesta inmunitaria de una manera inespecífica (es decir, para estimular la fagocitosis así como la producción de complemento e interferón). Los resultados han sido ambiguos y tales

protocolos no han generado inmunidad celular protectora; véase, por ejemplo, Fattal-German et al., 1992, Dev. Biol. Stand. 77, 115-120; Bizzini et al., 1990, FEMS Microbiol. Immunol. 2, 155-167.

La patente de Estados Unidos N.º 5.830.463, expedida el 3 de noviembre de 1998, a Duke et al. describió el uso de levaduras no patógenas que portan, al menos, un compuesto capaz de modular una respuesta inmunitaria y demostró que tales complejos son eficaces para estimular la inmunidad mediada por células, así como la humoral. En particular, la patente de Estados Unidos N.º 5.830.463 demostró que las levaduras que se modifican genéticamente para expresar un antígeno heterólogo pueden provocar una respuesta inmunitaria tanto celular como humoral cuando se administran a un animal.

La publicación de solicitud de patente WO2002/039951 divulga una composición terapéutica que comprende una célula dendrítica, un vehículo de levadura y, al menos, un antígeno, en la que la célula dendrítica se ha cargado intracelularmente con el vehículo de levadura y dicho, al menos, un antígeno.

A pesar de los avances actuales en la terapia del cáncer y la tecnología de vacunas, sigue existiendo la necesidad urgente de desarrollar vacunas y adyuvantes seguros y eficaces para las enfermedades que son susceptibles de inmunoterapia, incluida la enfermedad causada por la transformación neoplásica (cáncer) y, en particular, para aquellos cánceres que son especialmente resistentes al tratamiento que usa la terapia convencional contra el cáncer y las estrategias de vacunas genéricas.

Sumario de la invención

La invención se refiere a una composición terapéutica que comprende:

a) una levadura completa; y

b) una proteína de fusión expresada por la levadura, comprendiendo la proteína de fusión:

i) al menos un antígeno proteico o dominio inmunogénico del mismo seleccionado del grupo que consiste en: un antígeno de cáncer, un antígeno vírico y un antígeno bacteriano; y

ii) un péptido unido al extremo N del antígeno proteico o dominio inmunogénico del mismo, consistiendo el péptido en una secuencia de aminoácidos de M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO: 1).

El antígeno puede ser un antígeno de un patógeno de enfermedad infecciosa seleccionado entre un antígeno vírico o un antígeno bacteriano.

Un antígeno vírico puede seleccionarse de: antígeno de superficie y antígeno central del VHB; gag, env, rev, tar, tat, proteínas de la nucleocápside y transcriptasa inversa de virus de inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH, VIF); antígenos de VHC; proteínas de la nucleocápside de la gripe; proteínas de la nucleocápside de la parainfluenza; proteínas E6 y E7 de papiloma humano de tipo 16; LMP-1, LMP-2 y EBNA-2 de virus de Epstein-Barr; LAA o glucoproteína D de herpes. Un antígeno vírico también puede seleccionarse de: HBsAg, HBcAg, gag de VIH-1, antígeno central de hepatitis c, env de VIH-1, pol de VIH-1, tat de VIH-1, nef de VIH-1, E6 y E7 de HPV o glucoproteína D de VHS.

Un antígeno de cáncer puede seleccionarse de: Ras, CEA, EGF-R, Muc-1, PSA, BCR-abl, MAGE, NY-ESO-1, gp100, tirosinasa, PMSA, HER2/neu, hTERT, MARTI, TRP-1, TRP-2, formas oncogénicas mutantes de p53 (TP53), p73, BRAF, APC (poliposis adenomatosa coli), myc, VHL (proteína de von Hippel Lindau), Rb-1 (retinoblastoma), Rb-2, BRCA1, BRCA2, AR (receptor de andrógenos), Smad4, MDR1 o Flt-3.

En cualquiera de las composiciones terapéuticas de la invención, la levadura puede ser una levadura muerta completa. La levadura puede ser *S. cerevisiae*.

La invención también se refiere a cualquiera de las composiciones terapéuticas descritas anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

La divulgación de la solicitud se refiere a un método para proteger a un animal contra un cáncer, que comprende administrar a un animal que tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer, una vacuna para reducir o prevenir, al menos, un síntoma del cáncer en el animal. La vacuna comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) una proteína de fusión expresada por el vehículo de levadura, comprendiendo la proteína de fusión: (i) al menos un antígeno de cáncer; y (ii) un péptido unido al extremo N del antígeno de cáncer, consistiendo el péptido en, al menos, dos restos de aminoácido que son heterólogos para el antígeno de cáncer, donde el péptido estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraduccional de la proteína de fusión expresada. La proteína de fusión tiene los siguientes requisitos adicionales: (1) el resto de aminoácido en la posición uno de la proteína de fusión es una metionina; (2) el resto de aminoácido en la posición dos de la proteína de fusión no es una glicina o una prolina; (3) ninguno de los restos de aminoácido en las posiciones 2-6 de la proteína de

- fusión es una metionina; y, (4) ninguno de los restos de aminoácido en las posiciones 2-5 de la proteína de fusión es una lisina o una arginina. En un aspecto, el péptido consiste en, al menos, 2 -6 restos de aminoácido que son heterólogos para el antígeno de cáncer. En otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos de M-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆, donde X₂ es cualquier aminoácido excepto glicina, prolina, lisina o arginina; donde X₃ es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; donde X₄ es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; donde X₅ es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; y donde X₆ es cualquier aminoácido excepto metionina. En un aspecto, X₆ es un prolina. En otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos de M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO: 1).
- 10 La divulgación de la solicitud también se refiere a un método para proteger a un animal contra un cáncer, que comprende administrar a un animal que tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer, una vacuna para reducir o prevenir, al menos, un síntoma del cáncer en el animal. La vacuna comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) una proteína de fusión expresada por el vehículo de levadura, comprendiendo la proteína de fusión: (i) al menos un antígeno de cáncer; y (ii) una proteína de levadura unida al extremo N del antígeno de cáncer, en donde la proteína de levadura consiste en entre aproximadamente dos y aproximadamente 200 aminoácidos de una proteína de levadura endógena, en donde la proteína de levadura estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraducciona de la proteína de fusión expresada. En un aspecto, la proteína de levadura comprende un epitopo de anticuerpo para la identificación y la purificación de la proteína de fusión.
- 15 En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, se contemplan los siguientes aspectos adicionales. En un aspecto, la proteína de fusión comprende al menos dos o más antígenos de cáncer. En otro aspecto, la proteína de fusión comprende, al menos, uno o más dominios inmunogénicos de uno o más antígenos de cáncer. En otro aspecto, el antígeno de cáncer es un antígeno asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: melanomas, carcinoma de células escamosas, cánceres de mama, carcinomas de cabeza y cuello, carcinomas de tiroides, sarcomas de tejidos blandos, sarcomas óseos, cánceres testiculares, cánceres de próstata, cánceres de ovario, cánceres de vejiga, cánceres de piel, cánceres cerebrales, angiosarcomas, hemangiosarcomas, tumores de mastocitos, cánceres hepáticos primarios, cánceres de pulmón, cánceres pancreáticos, cánceres gastrointestinales, carcinomas de células renales, neoplasias hematopoyéticas y cánceres metastásicos de las mismas.
- 20 En otro aspecto más, el antígeno de cáncer es una proteína de tipo salvaje o mutante codificada por un gen *ras*. Por ejemplo, el antígeno de cáncer puede incluir una proteína de tipo salvaje o mutante codificada por un gen *ras* seleccionado del grupo que consiste en: genes *K-ras*, *N-ras* y *H-ras*. En un aspecto, el gen *ras* codifica una proteína Ras con mutaciones únicas o múltiples. En otro aspecto, el antígeno de cáncer comprende fragmentos de al menos 5-9 restos de aminoácido contiguos de una proteína Ras de tipo salvaje que contiene las posiciones de aminoácidos 12, 13, 59 o 61 en relación con la proteína Ras de tipo salvaje, en donde los restos de aminoácido en las posiciones 12, 13, 59 o 61 están mutados con respecto a la proteína Ras de tipo salvaje.
- 25 En otro aspecto más, el antígeno de cáncer consiste en una construcción de proteína de fusión que comprende múltiples dominios, en donde cada dominio consiste en un péptido de una oncoproteína, consistiendo el péptido en, al menos, 4 restos de aminoácido que flanquean cada lado e incluyen un aminoácido mutado que se encuentra en la proteína, donde la mutación está asociada con tumorigenicidad. En este aspecto, la construcción de proteína de fusión consiste en, al menos, un péptido que está fusionado en fase con otro antígeno tumoral mutado, en la que el péptido se selecciona del grupo que consiste en: (a) un péptido que comprende, al menos, desde las posiciones 8-16 de la SEQ ID NO: 3, en donde el resto de aminoácido en la posición 12 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con la SEQ ID NO: 3; (b) un péptido que comprende, al menos, desde las posiciones 9-17 de la SEQ ID NO: 3, en donde el resto de aminoácido en la posición 13 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con la SEQ ID NO: 3; (c) un péptido que comprende, al menos, desde las posiciones 55-63 de la SEQ ID NO: 3, en donde el resto de aminoácido en la posición 59 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con la SEQ ID NO: 3; y (d) un péptido que comprende, al menos, desde las posiciones 57-65 de la SEQ ID NO: 3, en donde el resto de aminoácido en la posición 61 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con la SEQ ID NO: 3. En un aspecto, el antígeno tumoral mutado es una proteína Ras que comprende al menos una mutación con respecto a una secuencia de proteína Ras de tipo salvaje.
- 30 En una realización de cualquiera de los métodos identificados anteriormente, la vacuna se administra al tracto respiratorio. En otra realización, la vacuna se administra por una vía de administración parenteral. En otra realización más, la vacuna comprende además células dendríticas o macrófagos, en donde el vehículo de levadura que expresa la proteína de fusión se administra a células dendríticas o macrófagos *ex vivo* y en donde la célula dendrítica o macrófago que contiene el vehículo de levadura que expresa el antígeno de cáncer se administra al animal. En un aspecto de esta realización, la célula dendrítica o el vehículo de levadura se ha cargado adicionalmente con antígeno libre. En un aspecto, la vacuna se administra como una vacuna terapéutica. En otro aspecto, la vacuna se administra como una vacuna profiláctica. En un aspecto, el animal tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma y cáncer renal. En otro aspecto, el animal tiene cáncer y la administración de la vacuna se produce después de la resección quirúrgica de un tumor del animal. En otro aspecto más, el animal tiene cáncer y la administración de la vacuna se produce después de la resección quirúrgica de un tumor del animal y después de la administración de un trasplante alogénico no mieloablativo de células madre. En otro aspecto más, el animal tiene cáncer y la administración de la

vacuna se produce después de la resección quirúrgica de un tumor del animal, después de la administración de trasplante alogénico no mieloablativo de células madre y después de la infusión de linfocitos de donante alogénico.

La divulgación de la solicitud también se refiere a un método para proteger a un animal contra un cáncer de cerebro o un cáncer de pulmón, que comprende administrar en el tracto respiratorio de un animal que tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer de cerebro o un cáncer de pulmón, una vacuna que comprende un vehículo de levadura y, al menos, un antígeno de cáncer, para reducir o prevenir, al menos, un síntoma de cáncer de cerebro o de cáncer de pulmón en el animal. En esta realización, la vacuna puede incluir cualquiera de las proteínas de fusión descritas anteriormente, así como otros antígenos. En un aspecto, la vacuna comprende, al menos, dos o más antígenos de cáncer. En otro aspecto, el antígeno de cáncer es una proteína de fusión que comprende, al menos, dos o más antígenos de cáncer. En otro aspecto más, el antígeno de cáncer es una proteína de fusión que comprende, al menos, uno o más dominios inmunogénicos de uno o más antígenos de cáncer.

En un aspecto de esta realización, la vacuna se administra por administración intranasal. En otro aspecto, la vacuna se administra por administración intratraqueal. En otra realización más, el vehículo de levadura y el antígeno de cáncer se administran a células dendríticas o macrófagos *ex vivo* y la célula dendrítica o macrófago que contiene el vehículo de levadura y el antígeno de cáncer se administran al tracto respiratorio del animal.

En un aspecto, el método protege al animal contra un cáncer cerebral, incluyendo, aunque sin limitación, un cáncer cerebral primario, tal como un glioblastoma multiforme o un cáncer metastásico de un órgano diferente. En otra realización, el método protege al animal contra un cáncer de pulmón, incluyendo, aunque sin limitación, un cáncer de pulmón primario (por ejemplo, carcinomas no microcíticos, carcinomas microcíticos y adenocarcinomas) o un cáncer metastásico de un órgano diferente. En un aspecto, la vacuna se administra como una vacuna terapéutica. En otro aspecto, la vacuna se administra como una vacuna profiláctica.

La divulgación de la solicitud también se refiere a un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral específica de antígeno y una respuesta inmunitaria mediada por células específica de antígeno en un animal. El método incluye administrar al animal una composición terapéutica que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) una proteína de fusión expresada por el vehículo de levadura, comprendiendo la proteína de fusión: (i) al menos un antígeno; y (ii) un péptido unido al extremo N del antígeno, consistiendo el péptido en al menos dos restos de aminoácido que son heterólogos para el antígeno, donde el péptido estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraducciona de la proteína de fusión expresada. La proteína de fusión tiene los siguientes requisitos adicionales: el resto de aminoácido en la posición uno de la proteína de fusión es una metionina; el resto de aminoácido en la posición dos de la proteína de fusión no es una glicina o una prolina; ninguno de los restos de aminoácido en las posiciones 2-6 de la proteína de fusión es una metionina; y, ninguno de los restos de aminoácido en las posiciones 2-5 de la proteína de fusión es una lisina o una arginina. En un aspecto, el péptido consiste en, al menos, seis restos de aminoácido que son heterólogos para el antígeno. En otro aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos de M-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆: donde X₂ es cualquier aminoácido excepto glicina, prolina, lisina o arginina; donde X₃ es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; donde X₄ es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; donde X₅ es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; y donde X₆ es cualquier aminoácido excepto metionina. En un aspecto, X₆ es un prolina. En un aspecto, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos de M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO: 1). En un aspecto, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno vírico, una molécula de superficie celular de mamífero sobreexpresada, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozoario, un antígeno de helminto, un antígeno de ectoparásito, un antígeno de cáncer, una molécula de célula de mamífero que alberga uno o más aminoácidos mutados, una proteína normalmente expresada pre o neonatalmente por células de mamíferos, una proteína cuya expresión se induce por la inserción de un agente epidemiológico (por ejemplo, virus), una proteína cuya expresión se induce por translocación génica y una proteína cuya expresión se induce por la mutación de secuencias reguladoras.

La divulgación de la solicitud también se refiere a una vacuna como se describe para su uso en el método anterior.

La divulgación de la solicitud se refiere adicionalmente a un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral específica de antígeno y una respuesta inmunitaria mediada por células específica de antígeno en un animal. El método incluye administrar al animal una composición terapéutica que comprende: (a) un vehículo de levadura; y (b) una proteína de fusión expresada por el vehículo de levadura, comprendiendo la proteína de fusión: (i) al menos un antígeno; y (ii) una proteína de levadura unida al extremo N del antígeno, en donde la proteína de levadura consiste en entre aproximadamente dos y aproximadamente 200 aminoácidos de una proteína de levadura endógena, en donde la proteína de levadura estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraducciona de la proteína de fusión expresada. En un aspecto, la proteína de levadura comprende un epítipo de anticuerpo para la identificación y la purificación de la proteína de fusión.

Otra realización de la divulgación de la solicitud es una vacuna como se describe para su uso en el método anterior.

Otra realización más de la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente que tiene cáncer, que comprende: (a) tratar a un paciente que tiene cáncer mediante transferencia no mieloablativa de células madre eficaz para establecer un quimerismo mixto de médula ósea estable, en el que las células madre son proporcionadas

por un donante alogénico; (b) administrar linfocitos obtenidos del donante alogénico al paciente; y (c) administrar al paciente, después de la etapa (b), una vacuna que comprende un vehículo de levadura y, al menos, un antígeno de cáncer. En un aspecto, el método también incluye administrar al donante alogénico, antes de la etapa (a), una vacuna que comprende un vehículo de levadura y, al menos, un antígeno de cáncer. En otra realización, el método incluye eliminar un tumor del paciente antes de realizar la etapa (a).

En un aspecto de este método, la vacuna comprende, al menos, dos o más antígenos de cáncer. En otro aspecto, el antígeno de cáncer es una proteína de fusión que comprende uno o más antígenos de cáncer. En otro aspecto más, el antígeno de cáncer es una proteína de fusión que comprende uno o más dominios inmunogénicos de uno o más antígenos de cáncer. En otro aspecto, el antígeno de cáncer consiste en una construcción de proteína de fusión que comprende múltiples dominios, en donde cada dominio consiste en un péptido de una oncoproteína, consistiendo el péptido en, al menos, 4 restos de aminoácido que flanquean cada lado e incluyen un aminoácido mutado que se encuentra en la proteína, donde la mutación está asociada con tumorigenicidad. En otro aspecto, el vehículo de levadura expresa el antígeno de cáncer y el antígeno de cáncer es una proteína de fusión que comprende: (a) al menos un antígeno de cáncer; y (b) un péptido unido al extremo N del antígeno de cáncer, consistiendo el péptido en, al menos, dos restos de aminoácido que son heterólogos para el antígeno de cáncer, en donde el péptido estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraduccional de la proteína de fusión expresada: en donde el resto de aminoácido en la posición uno de la proteína de fusión es una metionina; en donde el resto de aminoácido en la posición dos de la proteína de fusión no es una glicina o una prolina; en donde ninguno de los restos de aminoácido en las posiciones 2-6 de la proteína de fusión es una metionina; y, en donde ninguno de los restos de aminoácido en las posiciones 2-5 de la proteína de fusión es una lisina o una arginina. En otro aspecto, el vehículo de levadura expresa el antígeno de cáncer y el antígeno de cáncer es una proteína de fusión que comprende: (a) al menos un antígeno de cáncer; y (b) una proteína de levadura unida al extremo N del antígeno de cáncer, en donde la proteína de levadura consiste en entre aproximadamente dos y aproximadamente 200 aminoácidos de una proteína de levadura endógena, en donde la proteína de levadura estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraduccional de la proteína de fusión expresada.

En un aspecto de esta realización, la vacuna se administra por administración intranasal. En otro aspecto, la vacuna se administra por administración parenteral. En otro aspecto, el vehículo de levadura y el antígeno de cáncer se administran a células dendríticas o macrófagos *ex vivo* y la célula dendrítica o macrófago que contiene el vehículo de levadura y el antígeno de cáncer se administran al tracto respiratorio del animal.

En cualquiera de los métodos y composiciones descritos anteriormente de la presente divulgación, se incluyen los siguientes aspectos relacionados con el vehículo de levadura. En una realización, el vehículo de levadura se selecciona del grupo que consiste en una levadura completa, un esferoplasto de levadura, un citoplasto de levadura, una célula vacía de levadura y un extracto de membrana de levadura subcelular o fracción del mismo. En un aspecto, una célula de levadura o esferoplasto de levadura usado para preparar el vehículo de levadura se transformó con una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno de manera que el antígeno se expresa de forma recombinante mediante la célula de levadura o el esferoplasto de levadura. En este aspecto, la célula de levadura o el esferoplasto de levadura que expresa de forma recombinante el antígeno se usa para producir un vehículo de levadura que comprende un citoplasto de levadura, una célula vacía de levadura o un extracto de membrana de levadura subcelular o fracción del mismo. En un aspecto, el vehículo de levadura es de una levadura no patógena. En otro aspecto, el vehículo de levadura es de una de levadura seleccionada del grupo que consiste en: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Hansenula*, *Candida* y *Pichia*. En un aspecto, la *Saccharomyces* es *S. cerevisiae*.

En general, el vehículo de levadura y el antígeno pueden asociarse por cualquier técnica descrita en el presente documento. En un aspecto, el vehículo de levadura se cargó intracelularmente con el antígeno de cáncer. En otro aspecto, el antígeno de cáncer se adhirió covalente o no covalentemente al vehículo de levadura. En otro aspecto más, el vehículo de levadura y el antígeno de cáncer se asociaron por mezcla. En otro aspecto, el antígeno se expresa de forma recombinante por el vehículo de levadura o por la célula de levadura o esferoplasto de levadura del que derivaba el vehículo de levadura.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de barras que muestra que la vacuna Ras61-VAX basada en levadura controla tumores de pulmón inducidos por uretano preexistentes *in vivo*.

La Fig. 2 es un gráfico de barras que muestra que la vacuna RasV-VAX basada en levadura proporciona protección específica contra el crecimiento de tumor pulmonar cuando se administra por vía subcutánea e intranasal.

La Fig. 3 es un gráfico de barras que muestra que una vacuna basada en levadura que expresa Gag protege contra tumores intracraneales cuando la vacuna se administra por administración intranasal, pero no subcutánea.

La Fig. 4 es un gráfico de supervivencia que muestra que la vacuna basada en levadura que expresa EGFR (EGFR-tm VAX) protege contra la exposición a tumores intracraneales que expresan EGFR cuando se administra por vía subcutánea e intranasal.

La Fig. 5 es un gráfico de barras que muestra que la vacunación con una vacuna basada en levadura que expresa un antígeno tumoral mamario junto con un trasplante alogénico no mieloablativo de células madre protege contra la exposición tumoral.

La Fig. 6 es un gráfico de barras que muestra que la vacunación con una vacuna basada en levadura que expresa un antígeno de melanoma protege contra la exposición tumoral con tumores de melanoma que expresan el antígeno.

La Fig. 7 es un dibujo esquemático que muestra la construcción de diversas proteínas de fusión Ras mutantes para su uso en una vacuna basada en levadura.

10 Descripción detallada

La invención se refiere a una composición terapéutica que comprende:

a) una levadura completa; y

b) una proteína de fusión expresada por la levadura, comprendiendo la proteína de fusión:

i) al menos un antígeno proteico o dominio inmunogénico del mismo seleccionado del grupo que consiste en: un antígeno de cáncer, un antígeno vírico y un antígeno bacteriano; y

ii) un péptido unido al extremo N del antígeno proteico o dominio inmunogénico del mismo, consistiendo el péptido en una secuencia de aminoácidos de M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO: 1), así como aspectos relacionados como se describe anteriormente.

La divulgación de la solicitud también se refiere, en general, a composiciones y métodos para tratar y/o prevenir una diversidad de enfermedades y afecciones que son susceptibles de inmunoterapia y, en una realización particular, a composiciones y métodos para tratar y/o prevenir el cáncer en un animal. La divulgación incluye el uso de una vacuna basada en levadura que comprende un vehículo de levadura y un antígeno que se selecciona para provocar una respuesta inmunitaria celular y humoral específica de antígeno en un animal, para uso en vacunación profiláctica y/o terapéutica y la prevención y/o tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones. En particular, los autores de la presente invención describen en el presente documento el uso de vacunas basadas en levadura para reducir tumores en una variedad de formas diferentes de cáncer *in vivo*, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de mama y cáncer renal. También se describen en el presente documento mejoras en una vacuna basada en levadura que son aplicables no solo a terapias contra el cáncer, sino al tratamiento de una diversidad de métodos y composiciones inmunoterapéuticas.

Los autores de la presente invención han descrito previamente una tecnología de vacuna que provoca una potente inmunidad mediada por células, que incluye respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL). La tecnología de la vacuna implica usar levaduras y derivados de las mismas como vector de vacuna, en donde las levaduras se modifican genéticamente para expresar o están de otro modo cargadas con antígeno(s) relevante(s) para provocar una respuesta inmunitaria contra el (los) antígeno(s). Esta tecnología se describe, en general, en la patente de Estados Unidos N.º 5.830.463. La presente divulgación toma la tecnología de vacuna de levadura existente descrita en la Patente de Estados Unidos N.º 5.830.463 y proporciona mejoras específicas en un método para reducir el cáncer usando vehículos de levadura y antígenos de cáncer seleccionados, así como nuevas vacunas de levadura que comprenden nuevas proteínas que tienen estabilidad potenciada y métodos de uso de las nuevas vacunas de levadura para tratar cualquier enfermedad o afección para la cual la provocación de una respuesta inmunitaria puede tener un beneficio terapéutico. También se describe una descripción general de vacunas de levadura que pueden usarse en diversas realizaciones de la divulgación en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos número US20060104986.

En particular, los presentes inventores han descubierto que, mientras que múltiples vías de inmunización pueden ser de un modo equivalente eficaces para destruir tumores en la periferia, la vacuna basada en levadura usada en la presente divulgación es capaz de cebar células efectoras que pueden ser únicas para el pulmón. Por lo tanto, aunque todavía son eficaces otras vías de administración, la administración de las vacunas de levadura a través del tracto respiratorio (por ejemplo, intranasal, inhalada, intratraqueal) proporciona una respuesta inmunitaria sorprendentemente robusta y un efecto antitumoral que no se logra usando otras vías de administración investigadas hasta ahora. En particular, los presentes inventores han descubierto que la administración de la vacuna de levadura al tracto respiratorio es significativamente mejor en la reducción de tumores en cáncer de pulmón que cuando la vacuna se administra a la periferia. Quizás aún más sorprendente fue el resultado de que en tumores cerebrales, mientras que la administración de la vacuna de levadura al tracto respiratorio indujo una potente respuesta antitumoral en todos los modelos experimentales examinados hasta la fecha, la administración periférica de la vacuna (subcutánea) fue menos eficaz para inducir una respuesta antitumoral en el cerebro y en, al menos, un modelo experimental para cáncer cerebral, la administración periférica no proporcionó un efecto antitumoral significativo en el cerebro. Por lo tanto, las vacunas basadas en levadura de la presente divulgación pueden cebar precursores únicos de células efectoras inmunitarias en los pulmones y tales células inmunitarias pueden ser particularmente eficaces para cruzar la barrera hematoencefálica para influir en el curso del crecimiento del tumor

intracraneal. Sin quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores creen que la vía de inmunización puede ser un componente importante en el diseño de una vacuna eficaz para, al menos, tumores cerebrales y tumores de pulmón. Debido a que la vacuna basada en levadura de la divulgación es extremadamente fácil para múltiples vías de inmunización, la vacuna ofrece la esperanza de provocar de forma exclusiva respuestas inmunitarias altamente especializadas con un potencial hasta ahora poco apreciado para el tratamiento de algunos cánceres.

Los presentes inventores también han descubierto que el uso de las vacunas de levadura de la presente divulgación en una nueva modificación de un protocolo alogénico de médula ósea de quimera mixta previamente descrito por Luznik et al. (Blood 101 (4): 1645-1652, 2003) da como resultado una excelente inducción de inmunidad terapéutica y respuestas antitumorales *in vivo*. De manera significativa, este resultado se puede lograr sin la necesidad de utilizar preparaciones de tumores completos del receptor y sin la necesidad de mejorar la vacuna con modificadores de respuesta biológica, como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y sin la necesidad del uso de adyuvantes convencionales. Además, el uso del vehículo de levadura de la presente divulgación proporciona una flexibilidad extrema en la elección del antígeno y de las combinaciones de antígeno y proporciona mejoras significativas de inmunidad celular contra el antígeno. Además, la presente divulgación proporciona una mejora adicional del protocolo proporcionando la inmunización del donante con la vacuna de levadura de la divulgación de una manera controlada, selectiva.

Además, los presentes inventores han desarrollado mejoras en la tecnología de vacunas basadas en levadura usando nuevas proteínas de fusión que estabilizan la expresión de la proteína heteróloga en el vehículo de levadura y/o previenen la modificación postraducciona de la proteína heteróloga expresada. Específicamente, los inventores describen en el presente documento una nueva construcción para la expresión de antígenos heterólogos en levadura, en la que la(s) proteína(s) o péptido(s) antigénico(s) deseado(s) se fusiona(n) en su extremo amino a: (a) un péptido sintético; o (b) al menos a una parte de una proteína de levadura endógena, donde cada compañero de fusión proporciona estabilidad significativamente mejorada de la expresión de la proteína en la levadura y/o evita la modificación postraducciona de las proteínas por las células de levadura. Además, los péptidos de fusión proporcionan un epítipo que puede diseñarse para ser reconocido por un agente de selección, tal como un anticuerpo, y no parecen afectar de forma negativa a la respuesta inmunitaria contra el antígeno de vacunación de la construcción. Tales agentes son útiles para la identificación, selección y purificación de las proteínas útiles de la divulgación.

Además, la presente divulgación contempla el uso de péptidos que se fusionan al extremo C de la construcción de antígeno, particularmente para su uso en la selección e identificación de la proteína. Dichos péptidos incluyen, pero sin limitación, cualquier péptido sintético o natural, tal como una etiqueta peptídica (por ejemplo, 6X His) o cualquier otra etiqueta de epítipo corta. Los péptidos adheridos al extremo C de un antígeno de acuerdo con la divulgación pueden usarse con o sin la adición de los péptidos del extremo N analizados anteriormente.

Finalmente, los presentes inventores describen en el presente documento nuevos antígenos de proteína de fusión para su uso en una vacuna basada en levadura que proporciona múltiples dominios inmunogénicos a partir de uno o más antígenos dentro de la misma construcción. Tales proteínas de fusión son particularmente útiles cuando es deseable abarcar varias mutaciones diferentes y/o combinaciones de mutaciones que pueden producirse en una o algunas posiciones en el antígeno en la naturaleza, en una única construcción de vacuna. Por ejemplo, se sabe que hay varias mutaciones diferentes en los oncogenes de la familia de genes *ras* que pueden asociarse con un fenotipo de célula tumoral en la naturaleza. Las mutaciones en el codón que codifica el aminoácido 12 en la proteína Ras se encuentran en el 78% de los cánceres de páncreas, en el 34% de los cánceres colorrectales, en el 27% de los carcinomas de pulmón no microcíticos y en el 24% de los cánceres de ovario. También se encuentran diferentes mutaciones en las posiciones 13, 59 y 61 en una variedad de cánceres. Usando el enfoque de vacuna basada en levadura, los presentes inventores describen en el presente documento la producción de proteínas de fusión, incluyendo, pero sin limitación, proteínas de fusión basadas en mutaciones *ras*, que pueden capturar varias mutaciones en la misma posición y/o diferentes combinaciones de mutaciones en más de una posición, todo dentro de la misma vacuna antigénica.

Como descripción general de los métodos y composiciones usados en la presente divulgación, la vacuna y los métodos descritos en el presente documento integran la administración eficaz de antígenos con activación de linfocitos T extremadamente eficaz en una formulación de vacuna potente que no requiere componentes adyuvantes accesorios o mediadores biológicos. El enfoque de la vacuna descrito en el presente documento tiene muchos otros atributos que lo convierten en un candidato de vacuna ideal, incluyendo, pero sin limitación, facilidad de construcción, bajo coste de producción en masa, estabilidad biológica y seguridad. No aparecieron efectos extremadamente adversos de la inmunización con levadura completa en el momento de la vacunación inicial o tras la administración repetida en ratones, ratas, conejos, macacos de cola de cerdo (*Macaca nemestrina*), macacos rhesus o ratones CB.17^{scid} inmunodeficientes (observaciones no publicadas). Además, como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos número US20060104986, *citado anteriormente*, la capacidad de los complejos levadura-antígeno para madurar células dendríticas en células presentadoras de antígeno (APC) potentes mientras administran eficazmente antígenos en rutas de procesamiento tanto del MHC de clase-I como del MHC de clase-II indica que los vectores de vacuna basados en levadura proporcionarán una estrategia poderosa para la inducción de la inmunidad mediada por células dirigida contra una variedad de enfermedades infecciosas y

cánceres diana. De hecho, los datos descritos en el presente documento y los avances para la tecnología de vacunas basadas en levadura continúan demostrando este principio general a la vez que proporcionan mejoras significativas a la tecnología que no se habían apreciado previamente.

5 De acuerdo con la presente divulgación, un vehículo de levadura es cualquier célula de levadura (por ejemplo, una célula completa o intacta) o un derivado de la misma (véase a continuación) que puede usarse junto con un antígeno en una vacuna o composición terapéutica de la invención o como un adyuvante. El vehículo de levadura, por lo tanto, puede incluir, pero sin limitación, un microorganismo vivo de levadura intacta (es decir, una célula de levadura que tiene todos sus componentes incluyendo una pared celular), un microorganismo de levadura intacto inactivado (muerto), o sus derivados, que incluyen: un esferoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular), un citoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular y núcleo), una célula vacía de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular, núcleo y citoplasma), o un extracto de membrana de levadura subcelular o fracción del mismo (también referido anteriormente como una partícula de levadura subcelular).

15 Los esferoplastos de levadura se producen típicamente por digestión enzimática de la pared celular de la levadura. Dicho método se describe, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674. Los citoplastos de levadura se producen típicamente por enucleación de células de levadura. Dicho método se describe, por ejemplo, en Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55. Las células vacías de levadura se producen típicamente resellando una célula permeabilizada o lisada y pueden contener, pero no necesariamente, al menos algunos de los orgánulos de esa célula. Dicho método se describe, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1983, *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614 y Bussey *et al.*, 1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553, 185-196. Un extracto de membrana de levadura subcelular o fracción del mismo se refiere a una membrana de levadura que carece de un núcleo o citoplasma natural. La partícula puede ser de cualquier tamaño, incluyendo tamaños que varían desde el tamaño de una membrana de levadura natural a micropartículas producidas por sonicación u otros métodos de alteración de membrana conocidos por los expertos en la materia, seguido por resellado. Se describe un método para producir extractos de membrana de levadura subcelular, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674. También se pueden usar fracciones de extractos de membrana de levadura que contienen partes de membrana de levadura y, cuando el antígeno se expresó de forma recombinante por la levadura antes de la preparación del extracto de membrana de levadura, el antígeno de interés.

Puede usarse cualquier cepa de levadura para producir un vehículo de levadura de la presente divulgación. Las levaduras son microorganismos unicelulares que pertenecen a una de tres clases: ascomicetos, basidiomicetos y hongos imperfectos. Aunque se pueden usar cepas de levadura patógenas o mutantes no patógenos de las mismas de acuerdo con la presente invención, se prefieren cepas de levadura no patógenas. Los géneros preferidos de cepas de levadura incluyen *Saccharomyces*, *Candida* (que puede ser patógena), *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Yarrowia*, siendo más preferidas *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces* y siendo particularmente preferida *Saccharomyces*. Las especies preferidas de cepas de levadura incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida kefyri*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Yarrowia lipolytica*. Debe apreciarse que varias de estas especies incluyen una diversidad de subespecies, tipos, subtipos, etc. que se consideran incluidos dentro de las especies mencionadas anteriormente. Las especies de levaduras más preferidas incluyen *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* y *S. pombe*. *S. cerevisiae* es particularmente preferida ya que es relativamente fácil de manipular y es "generalmente reconocida como segura" o "GRAS" para su uso como aditivos alimentarios (GRAS, norma 62FR18938 propuesta por la FDA, el 17 de abril de 1997). Una realización de la presente divulgación es una cepa de levadura que puede replicar plásmidos a un número de copias particularmente alto, tal como una cepa *cirE* de *S. cerevisiae*.

50 En una realización, un vehículo de levadura preferido de la presente divulgación es capaz de fusionarse con el tipo celular al que se suministra el vehículo de levadura y el antígeno, tal como una célula dendrítica o macrófago, efectuando, de este modo, una administración particularmente eficaz del vehículo de levadura y, en muchas realizaciones, del antígeno, al tipo celular. Como se usa en el presente documento, la fusión de un vehículo de levadura con un tipo celular diana se refiere a la capacidad de la membrana de la célula de levadura, o partícula de la misma, para fusionarse con la membrana del tipo de célula diana (por ejemplo, célula dendrítica o macrófago), conduciendo a la formación de sincitios. Como se usa en el presente documento, un sincitio es una masa multinucleada de protoplasma producida por la unión de células. Se ha demostrado que varias proteínas de la superficie de virus (incluidas las de virus de inmunodeficiencia tales como VIH, virus de la gripe, poliovirus y adenovirus) y otros fusógenos (tales como los que participan en las fusiones entre óvulos y espermatozoides) pueden efectuar la fusión entre dos membranas (es decir, entre membranas celulares víricas y de mamífero o entre membranas celulares de mamíferos). Por ejemplo, un vehículo de levadura que produce un antígeno heterólogo gp120/gp41 de VIH en su superficie es capaz de fusionarse con un linfocito T CD4+. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que no es necesaria la incorporación de un resto de direccionamiento en el vehículo de levadura, aunque puede ser deseable en algunas circunstancias. Los presentes inventores han demostrado previamente que los vehículos de levadura de la presente divulgación son captados fácilmente por células dendríticas (así como otras

células, tales como macrófagos).

Los vehículos de levadura se pueden formular en composiciones de la presente invención y divulgación, incluyendo preparaciones a administrar a un paciente directamente o cargados en primer lugar en un vehículo tal como una
 5 célula dendrítica, usando varias técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, los vehículos de levadura pueden secarse por liofilización o congelarse por exposición a nitrógeno líquido o hielo seco. Las formulaciones que comprenden vehículos de levadura también pueden prepararse empaquetando la levadura en una torta o un comprimido, tal como se hace para la levadura usada en operaciones de fabricación de pan o
 10 cerveza. Además, antes de cargar en una célula dendrítica u otro tipo de administración con un antígeno, los vehículos de levadura también pueden mezclarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tampón isotónico que se tolera por la célula hospedadora. Los ejemplos de dichos excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas. También pueden usarse vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceite de
 15 sésamo, oleato de etilo o triglicéridos. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, glicerol o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades mínimas de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Las formulaciones convencionales pueden ser soluciones inyectables líquidas o sólidas que pueden
 20 recogerse en un líquido adecuado como una suspensión o solución para inyección. Por lo tanto, en una formulación no líquida, el excipiente puede comprender, por ejemplo, dextrosa, seroalbúmina humana y/o conservantes a los que puede añadirse agua o solución salina estéril antes de la administración.

Un componente de una composición terapéutica o vacuna de la presente invención incluye, al menos, un antígeno
 25 para vacunar a un animal. La composición o vacuna puede incluir, uno, dos, unos pocos, varios o una pluralidad de antígenos, incluyendo uno o más dominios inmunogénicos de uno o más antígenos, según se desee. De acuerdo con la presente invención, el uso general en el presente documento del término "antígeno" se refiere: a cualquier parte de una proteína (péptido, proteína parcial, proteína de longitud completa), donde la proteína es de origen natural o se ha obtenido sintéticamente, a una composición celular (célula completa, lisado celular o células
 30 alteradas), a un organismo (organismo completo, lisado o células alteradas) o a un carbohidrato u otra molécula o una parte de la misma, donde el antígeno desencadena una respuesta inmunitaria específica de antígeno (respuesta inmunitaria humoral y/o celular) o actúa alternativamente como tolerógeno, contra antígenos iguales o similares que se encuentran dentro de las células y tejidos del animal al que se administra el antígeno.

En una realización de la presente invención, cuando sea deseable estimular una respuesta inmunitaria, el término
 35 "antígeno" puede usarse indistintamente con el término "inmunógeno" y se usa en el presente documento para describir una proteína, péptido, composición celular, organismo u otra molécula que provoque una respuesta inmunitaria humoral y/o celular (es decir, que sea antigénica), de modo que la administración del inmunógeno a un animal (por ejemplo, a través de una vacuna de la presente invención) genera una respuesta inmunitaria específica
 40 de antígeno contra antígenos iguales o similares que se encuentran dentro de los tejidos del animal. Por lo tanto, vacunar un animal contra un antígeno particular significa, en una realización, que se provoca una respuesta inmunitaria contra el antígeno como resultado de la administración del antígeno. La vacunación preferentemente da como resultado un efecto protector o terapéutico, donde la exposición posterior al antígeno (o una fuente del antígeno) provoca una respuesta inmunitaria contra el antígeno (o fuente) que reduce o previene una enfermedad o
 45 afección en el animal. El concepto de vacunación es bien conocido en la técnica. La respuesta inmunitaria que se provoca mediante la administración de una composición terapéutica de la presente invención puede ser cualquier cambio detectable en cualquier faceta de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta celular, respuesta humoral, producción de citoquinas), en comparación con la ausencia de la administración de la vacuna.

En otra realización, cuando sea deseable suprimir una respuesta inmunitaria contra un antígeno dado, un antígeno
 50 puede incluir un tolerógeno. De acuerdo con la presente invención, se usa un tolerógeno para describir una proteína, péptido, composición celular, organismo u otra molécula que se proporciona en una forma, cantidad o vía de administración tal que existe una respuesta inmunitaria reducida o modificada al antígeno y, preferentemente, falta de respuesta sustancial, anergia, otra inactivación o eliminación de células del sistema inmunitario en respuesta al
 55 contacto con el tolerógeno o con una célula que expresa o presenta dicho tolerógeno.

Un "antígeno de vacunación" puede ser un inmunógeno o un tolerógeno, pero es un antígeno usado en una vacuna, donde se va a provocar una respuesta biológica (provocación de una respuesta inmunitaria, tolerancia) contra el
 60 antígeno de vacunación.

Un dominio inmunogénico de un antígeno dado puede ser cualquier porción del antígeno (es decir, un fragmento o subunidad peptídica) que contiene, al menos, un epítipo que actúa como un inmunógeno cuando se administra a un animal. Por ejemplo, una única proteína puede contener múltiples dominios inmunogénicos diferentes.

Se define un epítipo en el presente documento como un único sitio inmunogénico dentro de un antígeno dado que
 65 es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria, o un único sitio tolerogénico dentro de un antígeno dado que

es suficiente para suprimir, eliminar o hacer inactiva una respuesta inmunitaria. Los expertos en la materia reconocerán que los epítomos de linfocitos-T son de tamaño y composición diferentes que los epítomos de linfocitos-B y que los epítomos presentados a través de la ruta del MHC de clase I difieren de los epítomos presentados a través de la ruta del MHC de clase II. Un antígeno puede ser tan pequeño como un único epítomo o más grande y puede incluir múltiples epítomos. Por tanto, el tamaño de un antígeno puede ser tan pequeño como de aproximadamente 5-12 aminoácidos (por ejemplo, un péptido) y tan grande como: una proteína de longitud completa, incluyendo multímeros y proteínas de fusión, proteínas quiméricas, células completas, microorganismos completos o partes de los mismos (por ejemplo, lisados de células completas o extractos de microorganismos). Además, los antígenos incluyen carbohidratos, tales como los expresados en células cancerosas, que pueden cargarse en un vehículo de levadura o en una composición de la invención. Se apreciará que, en algunas realizaciones (es decir, cuando el antígeno se expresa por el vehículo de levadura a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante), el antígeno es una proteína, una proteína de fusión, una proteína quimérica o un fragmento de la misma, en lugar de una célula completa o microorganismo. En realizaciones preferidas, el antígeno se selecciona del grupo de un antígeno tumoral o un antígeno de un patógeno de enfermedad infecciosa (es decir, un antígeno patógeno). En una realización, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en: un antígeno vírico, una molécula de superficie celular de mamífero sobreexpresada, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozario, un antígeno de helminto, un antígeno de ectoparásito, un antígeno de cáncer, una molécula de célula de mamífero que alberga uno o más aminoácidos mutados, una proteína normalmente expresada pre o neonatalmente por células de mamíferos, una proteína cuya expresión se induce por la inserción de un agente epidemiológico (por ejemplo, virus), una proteína cuya expresión se induce por translocación génica y una proteína cuya expresión se induce por la mutación de secuencias reguladoras.

De acuerdo con la presente invención, un antígeno adecuado para usar en la presente composición o vacuna puede incluir dos o más dominios inmunogénicos o epítomos del mismo antígeno, dos o más dominios inmunogénicos de antígenos o epítomos de la misma célula, tejido u organismo, o dos o más antígenos diferentes, dominios inmunogénicos o epítomos de diferentes células, tejidos u organismos. Preferentemente, el antígeno es heterólogo para la cepa de levadura (es decir, no es una proteína que se produce naturalmente por la cepa de levadura en ausencia de manipulación genética o biológica).

Una realización de la divulgación se refiere a varias proteínas mejoradas para su uso como antígenos en las vacunas de la invención. Específicamente, la presente divulgación proporciona nuevas construcciones de proteínas de fusión que estabilizan la expresión de la proteína heteróloga en el vehículo de levadura y/o previenen la modificación postraduccional de la proteína heteróloga expresada. La mayoría de las veces, estas proteínas de fusión se expresan como proteínas recombinantes por el vehículo de levadura (por ejemplo, por una levadura intacta o esferoplasto de levadura, que opcionalmente puede procesarse adicionalmente a un citoplasto de levadura, célula vacía de levadura o extracto de membrana de levadura o fracción de la misma), aunque es una realización de la divulgación que una o muchas de tales proteínas de fusión puedan cargarse en un vehículo de levadura o formar complejos o mezclarse de otro modo con un vehículo de levadura como se describe anteriormente para formar una vacuna de la presente invención.

Una de tales construcciones de fusión útiles en la presente divulgación es una proteína de fusión que incluye: a) al menos un antígeno (incluyendo dominios inmunogénicos y epítomos de un antígeno de longitud completa, así como diversas proteínas de fusión y múltiples construcciones de antígenos como se describen en el presente documento); y (b) un péptido sintético. El péptido sintético se une preferentemente al extremo N del antígeno de cáncer. Este péptido consiste en, al menos, dos restos de aminoácido que son heterólogos para el antígeno de cáncer, donde el péptido estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraduccional de la proteína de fusión expresada. El péptido sintético y la parte del extremo N del antígeno juntos forman una proteína de fusión que tiene los siguientes requisitos: (1) el resto de aminoácido en la posición uno de la proteína de fusión es una metionina (es decir, el primer aminoácido en el péptido sintético es una metionina); (2) el resto de aminoácido en la posición dos de la proteína de fusión no es una glicina o una prolina (es decir, el segundo aminoácido en el péptido sintético no es una glicina o una prolina); (3) ninguno de los restos de aminoácido en las posiciones 2-6 de la proteína de fusión es una metionina (es decir, los aminoácidos en las posiciones 2-6, sean parte del péptido sintético o de la proteína, si el péptido sintético es más corto de 6 aminoácidos, no incluyen una metionina); y (4) ninguno de los aminoácidos en las posiciones 2-5 de la proteína de fusión es una lisina o una arginina (es decir, los aminoácidos en las posiciones 2-5, sean parte del péptido sintético o de la proteína, si el péptido sintético es más corto de 5 aminoácidos, no incluyen una lisina o una arginina). El péptido sintético puede ser tan corto como de dos aminoácidos, pero es, más preferentemente, de al menos 2-6 aminoácidos (incluyendo 3, 4, 5 aminoácidos) y puede ser más largo que 6 aminoácidos, en números enteros, de hasta aproximadamente 200 aminoácidos.

En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos de $M-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$, donde M es metionina; donde X_2 es cualquier aminoácido excepto glicina, prolina, lisina o arginina; donde X_3 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; donde X_4 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; donde X_5 es cualquier aminoácido excepto metionina, lisina o arginina; y donde X_6 es cualquier aminoácido excepto metionina. En una realización, el resto X_6 es una prolina. Una secuencia sintética ejemplar que potencia la estabilidad de expresión de un antígeno en una célula de levadura y/o evita la modificación postraduccional de la

proteína en la levadura incluye la secuencia M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO: 1). Además de la estabilidad mejorada del producto de expresión, los presentes inventores creen que este compañero de fusión no parece afectar de forma negativa a la respuesta inmunitaria contra el antígeno de vacunación en la construcción. Además, los péptidos de fusión sintéticos pueden diseñarse para proporcionar un epítipo que pueda reconocerse por un agente de selección, tal como un anticuerpo.

De acuerdo con la presente divulgación, "aminoácidos heterólogos" son una secuencia de aminoácidos que no se encuentran naturalmente (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de aminoácidos especificada o que no están relacionados con la función de la secuencia de aminoácidos especificada o que no estarían codificados por los nucleótidos que flanquean la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica la secuencia de aminoácidos especificada como existe en el gen, si tales nucleótidos en la secuencia de origen natural se tradujeran usando el uso de codones convencional para el organismo del que se obtiene la secuencia de aminoácidos dada. Por lo tanto, al menos dos restos de aminoácido que son heterólogos para el antígeno de cáncer son dos restos de aminoácido cualesquiera que no se encuentran de manera natural flanqueando el antígeno de cáncer.

Otra realización de la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión que incluye: a) al menos un antígeno (incluyendo dominios inmunogénicos y epítopos de un antígeno de longitud completa, así como diversas proteínas de fusión y múltiples construcciones de antígenos como se describen en otra parte en el presente documento) que se fusiona con (b) al menos una porción de una proteína de levadura endógena. La proteína de levadura endógena preferentemente se fusiona con el extremo N-terminal del (de los) antígeno(s) de cáncer y proporciona una estabilidad significativamente mejorada de la expresión de la proteína en la levadura y/o evita la modificación postraduccional de las proteínas por las células de levadura. Además, el antígeno de levadura endógeno, al igual que el péptido sintético, es un compañero de fusión que no parece afectar de forma negativa a la respuesta inmunitaria contra el antígeno de vacunación de la construcción. Ya pueden estar disponibles anticuerpos que se unen selectivamente al antígeno endógeno o pueden generarse fácilmente. Finalmente, si se desea dirigir una proteína a una ubicación celular particular (por ejemplo, en la vía secretora, en la mitocondria, en el núcleo), entonces la construcción puede usar las señales endógenas para la proteína de la levadura para asegurarse de que la maquinaria celular esté optimizada para ese sistema de administración.

La proteína de levadura endógena consiste en entre aproximadamente dos y aproximadamente 200 aminoácidos (o 22kDa máximo) de una proteína de levadura endógena, en donde la proteína de levadura estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o evita la modificación postraduccional de la proteína de fusión expresada. Se puede usar cualquier proteína de levadura endógena adecuada en esta realización y las proteínas particularmente preferidas incluyen, pero sin limitación, SUC2 (invertasa de levadura; que es un buen candidato para poder expresar una proteína tanto citosólicamente como dirigiéndola a la ruta secretora desde el mismo promotor, pero depende de la fuente de carbono en el medio); secuencia líder señal de factor alfa; SEC7; CPY; productos génicos de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa PCK1, fosfogliceroquinasa PGK y triosa fosfato isomerasa TPI para su expresión reprimible en glucosa y localización citosólica; CWp2p para su localización y retención en la pared celular; las proteínas de choque térmico SSA1, SSA3, SSA4, SSC1 y KAR2, cuya expresión se induce y siendo dichas proteínas más termoestables tras exposición de las células a tratamiento por calor; la proteína mitocondrial CYC1 para su importación a la mitocondria; genes BUD para la localización en la yema de la célula de levadura durante la fase inicial de la formación de células hijas; ACT1 para el anclaje en haces de actina.

En una realización, la(el) proteína/péptido de levadura endógena(o) comprende un epítipo de anticuerpo para la identificación y la purificación de la proteína de fusión. Preferentemente, está disponible o se produce un anticuerpo que se une selectivamente al compañero de fusión. De acuerdo con la presente divulgación, la expresión "se une selectivamente a" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o compañero de unión de la presente divulgación de unirse preferentemente a proteínas especificadas. Más específicamente, la expresión "se une selectivamente" se refiere a la unión específica de una proteína a otra (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento del mismo o compañero de unión para un antígeno), donde el nivel de unión, medido por cualquier ensayo convencional (por ejemplo, un inmunoensayo), es estadísticamente mayor significativamente que el control de fondo para el ensayo. Por ejemplo, cuando se realiza un inmunoensayo, los controles típicamente incluyen un pocillo/tubo de reacción que contiene el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno en solitario (es decir, en ausencia de antígeno), en donde una cantidad de reactividad (por ejemplo, unión no específica al pocillo) por el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo en ausencia del antígeno se considera el valor de fondo. La unión puede medirse usando una diversidad de métodos convencionales en la técnica incluyendo inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, ELISA), ensayos de inmunotransferencia, etc.).

Los anticuerpos se caracterizan por que comprenden dominios de inmunoglobulina y, como tales, son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas de proteínas. Los anticuerpos aislados de la presente divulgación pueden incluir suero que contiene tales anticuerpos o anticuerpos que se han purificado en diversos grados. Los anticuerpos completos de la presente divulgación pueden ser policlonales o monoclonales. Como alternativa, también se pueden emplear en la divulgación equivalentes funcionales de anticuerpos completos, tales como fragmentos de unión a antígeno en los que uno o más dominios de anticuerpos están truncados o ausentes (por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' o F(ab)₂), así como anticuerpos genéticamente modificados o fragmentos de unión a antígeno de los

mismos, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos que pueden unirse a más de un epítipo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), o anticuerpos que pueden unirse a uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, anticuerpos bi- o multispecíficos).

5 En general, en la producción de un anticuerpo, un animal experimental adecuado, tales como, por ejemplo, pero sin limitación, un conejo, una oveja, un hámster, una cobaya, un ratón, una rata o un pollo, se expone a un antígeno contra el cual se desea un anticuerpo. Normalmente, un animal se inmuniza con una cantidad efectiva de antígeno que se inyecta en el animal. Una cantidad efectiva de antígeno se refiere a la cantidad necesaria para inducir la producción de anticuerpos por el animal. A continuación, se deja que el sistema inmunitario del animal responda durante un período de tiempo predeterminado. El proceso de inmunización se puede repetir hasta que se encuentre que el sistema inmunitario produce anticuerpos para el antígeno. Para obtener anticuerpos policlonales específicos para el antígeno, se recoge suero del animal que contiene los anticuerpos deseados (o en el caso de un pollo, se puede recoger el anticuerpo de los huevos). Tal suero es útil como reactivo. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar adicionalmente del suero (o huevos), por ejemplo, tratando el suero con sulfato de amonio.

15 Los anticuerpos monoclonales se pueden producir según la metodología de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497, 1975). Por ejemplo, Se recuperan linfocitos B del bazo (o de cualquier tejido adecuado) de un animal inmunizado y luego se fusionan con células de mieloma para obtener una población de células de hibridoma capaces de crecer continuamente en un medio de cultivo adecuado. Los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se seleccionan ensayando la capacidad del anticuerpo producido por el hibridoma para unirse al antígeno deseado.

25 La divulgación también se extiende a polipéptidos que no son anticuerpos, a veces denominados compañeros de unión, que se han diseñado para unirse específicamente a, y activar o inhibir según corresponda, una proteína de la divulgación. Se proporcionan ejemplos del diseño de tales polipéptidos, que poseen una especificidad de ligando prescrita en Beste et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 1898-1903, 1999).

30 En otra realización más de la invención, la porción de antígeno de la vacuna se produce como una proteína de fusión que comprende dos o más antígenos. En un aspecto, la proteína de fusión puede incluir dos o más dominios inmunogénicos o dos o más epítopos de uno o más antígenos. En una realización particularmente preferida, la proteína de fusión comprende dos o más dominios inmunogénicos y, preferentemente, múltiples dominios, de un antígeno, en donde los múltiples dominios juntos abarcan varias mutaciones diferentes y/o combinaciones de mutaciones que pueden ocurrir en una o algunas posiciones en el antígeno en la naturaleza. Esto proporciona la ventaja particular de ser capaz de proporcionar una vacuna contra un antígeno muy específico que se sabe que está mutado de forma variable en una variedad de pacientes. Tal vacuna puede proporcionar inmunización específica de antígeno en una amplia serie de pacientes. Por ejemplo, una proteína de fusión de dominio múltiple útil en la presente invención puede tener múltiples dominios, en donde cada dominio consiste en un péptido de una proteína particular, consistiendo el péptido en, al menos, 4 restos de aminoácido que flanquean cada lado e incluyen un aminoácido mutado que se encuentra en la proteína, en donde la mutación está asociada con una enfermedad particular (por ejemplo, cáncer).

40 Ras es un ejemplo de un oncogén en el que se sabe que varias mutaciones ocurren en posiciones particulares y están asociadas con el desarrollo de uno o más tipos de cáncer. Por lo tanto, se pueden construir proteínas de fusión que consisten en péptidos que contienen un resto particular que se sabe que está mutado en ciertos cánceres, en el que cada dominio contiene una mutación diferente en ese sitio para cubrir varias o todas las mutaciones conocidas en ese sitio. Por ejemplo, con respecto a Ras, se pueden proporcionar dominios inmunogénicos que comprenden al menos 4 aminoácidos en cada lado y que incluyen la posición 12, en donde cada dominio tiene una sustitución diferente para la glicina que normalmente ocurre en la proteína Ras no mutada. En un ejemplo, el antígeno de cáncer comprende fragmentos de al menos 5-9 restos de aminoácido contiguos de una proteína Ras de tipo salvaje que contiene las posiciones de aminoácidos 12, 13, 59 o 61 en relación con la proteína Ras de tipo salvaje, en donde los restos de aminoácido en las posiciones 12, 13, 59 o 61 están mutados con respecto a la proteína Ras de tipo salvaje. En un aspecto, la construcción de proteína de fusión consiste en, al menos, un péptido que está fusionado en fase con otro antígeno tumoral mutado (por ejemplo, una proteína Ras que comprende al menos una mutación en relación con una secuencia de proteína Ras de tipo silvestre), en la que el péptido se selecciona del grupo que consiste en: (a) un péptido que comprende, al menos, desde las posiciones 8-16 de la SEQ ID NO: 3, en donde el resto de aminoácido en la posición 12 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con la SEQ ID NO: 3; (b) un péptido que comprende, al menos, desde las posiciones 9-17 de la SEQ ID NO: 3, en donde el resto de aminoácido en la posición 13 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con la SEQ ID NO: 3; (c) un péptido que comprende, al menos, desde las posiciones 55-63 de la SEQ ID NO: 3, en donde el resto de aminoácido en la posición 59 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con la SEQ ID NO: 3; y (d) un péptido que comprende, al menos, desde las posiciones 57-65 de la SEQ ID NO: 3, en donde el resto de aminoácido en la posición 61 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con la SEQ ID NO: 3. Se observa que estas posiciones también corresponden a cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11 o 13, ya que las secuencias humanas y de ratón son idénticas en esta región de la proteína y ya que K-Ras, H-Ras y N-Ras son idénticos en esta región.

65 Otros antígenos para los cuales tales estrategias pueden ser particularmente útiles en la presente divulgación, serán

evidentes para los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación: cualquier oncogén, TP53 (también conocido como p53), p73, BRAF, APC, Rb-1, Rb-2, VHL, BRCA1, BRCA2, AR (receptor de andrógenos), Smad4, MDR1 y/o Flt-3.

5 En una realización de la presente divulgación, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento puede producirse con, al menos, uno y hasta aproximadamente 20, aminoácidos heterólogos adicionales que flanquean cada uno de los extremos C y/o N de la secuencia de aminoácidos especificada. Puede decirse que la proteína o polipéptido resultante "consiste esencialmente en" la secuencia de aminoácidos especificada. Como se ha
10 analizado anteriormente, de acuerdo con la presente divulgación, los aminoácidos heterólogos son una secuencia de aminoácidos que no se encuentran naturalmente (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de aminoácidos especificada o que no están relacionados con la función de la secuencia de aminoácidos especificada o que no estarían codificados por los nucleótidos que flanquean la secuencia de ácido nucleico de origen natural que codifica la secuencia de aminoácidos especificada como existe en el gen, si tales nucleótidos en la secuencia de origen natural se tradujeran usando el uso de codones convencional para el
15 organismo del que se obtiene la secuencia de aminoácidos dada. Del mismo modo, la expresión "que consiste esencialmente en", cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos especificada que puede estar flanqueada por, al menos, uno y hasta como mucho aproximadamente 60, nucleótidos heterólogos adicionales en cada uno de los extremos 5' y/o 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos
20 especificada. Los nucleótidos heterólogos no se encuentran de forma natural (es decir, no se encuentran en la naturaleza, *in vivo*) flanqueando la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos especificada tal como existe en el gen natural o no codifica una proteína que confiere cualquier función adicional a la proteína o cambia la función de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos especificada.

25 Los antígenos tumorales útiles en la presente invención pueden incluir un antígeno tumoral tal como una proteína, glucoproteína o carbohidratos superficiales de una célula tumoral, un epítipo de un antígeno tumoral, una célula tumoral completa, mezclas de células tumorales y porciones de las mismas (por ejemplo, lisados). En una realización, los antígenos tumorales útiles en la presente invención se pueden aislar o derivar de una muestra de tumor autólogo. Una muestra de tumor autólogo deriva del animal al que se va a administrar la composición
30 terapéutica. Por lo tanto, tales antígenos estarán presentes en el cáncer contra el cual se va a provocar una respuesta inmunitaria. En un aspecto, el antígeno tumoral proporcionado en una vacuna se aísla o deriva de al menos dos y preferentemente de una pluralidad de muestras de tumor alogénico del mismo tipo de tumor histológico. De acuerdo con la presente invención, una pluralidad de muestras de tumor alogénico son muestras tumorales del mismo tipo de tumor histológico, aisladas de dos o más animales de la misma especie que difieren genéticamente al menos dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y típicamente en otros loci
35 genéticos. Por lo tanto, si se administran conjuntamente, la pluralidad de antígenos tumorales puede ser representativa de sustancialmente todos los antígenos tumorales presentes en cualquiera de los individuos de los que deriva el antígeno. Esta realización del método proporciona una vacuna que compensa las variaciones naturales entre pacientes individuales en la expresión de antígenos tumorales a partir de tumores del mismo tipo de tumor histológico. Por lo tanto, la administración de esta composición terapéutica es eficaz para provocar una respuesta
40 inmunitaria contra una variedad de antígenos tumorales de manera que la misma composición terapéutica se puede administrar a una variedad de individuos diferentes. En algunas realizaciones, se pueden administrar a un animal antígenos de tumores de diferentes tipos de tumores histológicos, a fin de proporcionar una vacuna muy amplia.

45 Preferentemente, el tumor del que se aísla o deriva el antígeno es cualquier tumor o cáncer, incluyendo, pero sin limitación, melanomas, carcinoma de células escamosas, cánceres de mama, carcinomas de cabeza y cuello, carcinomas de tiroides, sarcomas de tejidos blandos, sarcomas óseos, cánceres testiculares, cánceres de próstata, cánceres de ovario, cánceres de vejiga, cánceres de piel, cánceres cerebrales, angiosarcomas, hemangiosarcomas, tumores de mastocitos, cánceres hepáticos primarios, cánceres de pulmón, cánceres pancreáticos, cánceres
50 gastrointestinales, carcinomas de células renales, neoplasias hematopoyéticas y cánceres metastásicos de las mismas. Los ejemplos de antígenos de cáncer específicos para usarse en una vacuna de la presente invención incluyen pero sin limitación, MAGE (incluyendo pero sin limitación MAGE3, MAGEA6, MAGEA10), NY-ESO-1, gp100, tirosinasa, EGF-R, PSA, PMSA, CEA, HER2/neu, Muc-1, hTERT, MART1, TRP-1, TRP-2, BCR-abl y formas oncogénicas mutantes de p53 (TP53), p73, ras, BRAF, APC (poliposis adenomatosa coli), myc, VHL (proteína de von Hippel Lindau), Rb-1 (retinoblastoma), Rb-2, BRCA1, BRCA2, AR (receptor de andrógenos), Smad4, MDR1, Flt-
55 3.

De acuerdo con la presente invención, un antígeno de cáncer puede incluir cualquier antígeno tumoral como se describe anteriormente, además de cualquier otro antígeno que esté asociado con el riesgo de adquirir o desarrollar
60 cáncer o para el cual una respuesta inmunitaria contra tal antígeno pueda tener un beneficio terapéutico contra un cáncer. Por ejemplo, un antígeno de cáncer podría incluir, pero sin limitación, un antígeno tumoral, una molécula de célula de mamífero que alberga uno o más aminoácidos mutados, una proteína normalmente expresada pre o neonatalmente por células de mamíferos, una proteína cuya expresión se induce por la inserción de un agente epidemiológico (por ejemplo, virus), una proteína cuya expresión se induce por translocación génica y una proteína
65 cuya expresión se induce por la mutación de secuencias reguladoras. Algunos de estos antígenos también pueden servir como antígenos en otros tipos de enfermedades (por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria).

En un aspecto de la divulgación, el antígeno útil en la presente composición es un antígeno de un patógeno (que incluye el patógeno completo) y, particularmente, de un patógeno que está asociado con (por ejemplo, provoca o contribuye a) una enfermedad infecciosa. Un antígeno de un patógeno de enfermedad infecciosa puede incluir antígenos que tienen epítopos que son reconocidos por linfocitos T, antígenos que tienen epítopos que son reconocidos por linfocitos B, antígenos que se expresan exclusivamente por patógenos y antígenos que se expresan por patógenos y por otras células. Los antígenos patógenos pueden incluir células completas y el organismo patógeno completo, así como lisados, extractos u otras fracciones de los mismos. En algunos casos, un antígeno puede incluir organismos o partes de los mismos que normalmente no se consideran patógenos en un animal, pero contra los que, no obstante, se desea la inmunización. Los antígenos pueden incluir uno, dos o una pluralidad de antígenos que son representativos de sustancialmente todos los antígenos presentes en el patógeno de enfermedad infecciosa contra el que se va a administrar la vacuna. En otras realizaciones, pueden usarse antígenos de dos o más cepas diferentes del mismo patógeno o de diferentes patógenos para aumentar la eficacia terapéutica y/o la eficacia de la vacuna.

De acuerdo con la presente divulgación, un antígeno patógeno incluye, pero sin limitación, un antígeno que se expresa por una bacteria, un virus, un parásito o un hongo. Los antígenos patógenos preferidos para su uso en el método de la presente divulgación incluyen antígenos que provocan una enfermedad infecciosa crónica en un animal. En una realización, un antígeno patógeno para su uso en el método o composición de la presente invención incluye un antígeno de un virus. Los ejemplos de antígenos de virus para usarse en una vacuna de la presente invención incluyen, pero sin limitación, env, gag, rev, tar, tat, proteínas de la nucleocápside y transcriptasa inversa de virus de inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH, VIF); antígeno de superficie y antígeno central del VHB; antígenos de VHC; proteínas de la nucleocápside de la gripe; proteínas de la nucleocápside de la parainfluenza; proteínas E6 y E7 de papiloma humano de tipo 16; LMP-1 de virus de Epstein-Barr, LMP-2 y EBNA-2; LAA y glucoproteína D de herpes; así como proteínas similares de otros virus. Los antígenos particularmente preferidos para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, gag de VIH-1, env de VIH-1, pol de VIH-1, tat de VIH-1, nef de VIH-1, HbsAG, HbcAg, antígeno central de hepatitis c, HPV E6 y E7, glucoproteína D del VHS y el antígeno protector de *Bacillus anthracis*.

Otros antígenos preferidos para incluir en las composiciones (vacunas) de la presente divulgación incluyen antígenos que son capaces de suprimir una respuesta inmunitaria no deseada o dañina, como la causada, por ejemplo, por alérgenos, antígenos autoinmunitarios, agentes inflamatorios, antígenos implicados en GVHD, ciertos cánceres, antígenos de choque séptico y antígenos implicados en el rechazo de trasplantes. Tales compuestos incluyen, pero sin limitación, antihistaminas, ciclosporina, corticosteroides, FK506, péptidos correspondientes a receptores de linfocitos T implicados en la producción de una respuesta inmunitaria dañina, ligandos Fas (es decir, compuestos que se unen al dominio extracelular o citosólico de receptores Fas celulares, induciendo de este modo la apoptosis), complejos de MHC adecuados presentados de tal manera que se logre tolerancia o anergia, receptores de linfocitos T y antígenos autoinmunitarios, preferentemente en combinación con un modificador de respuesta biológica capaz de potenciar o suprimir la inmunidad celular y/o humoral.

Otros antígenos útiles en la presente divulgación y combinaciones de antígenos serán evidentes para los expertos en la materia. La presente divulgación no está restringida al uso de los antígenos descritos anteriormente.

De acuerdo con la presente divulgación, la expresión "complejo vehículo de levadura-antígeno" o "complejo levadura-antígeno" se usa genéricamente para describir cualquier asociación de un vehículo de levadura con un antígeno. Dicha asociación incluye la expresión del antígeno por la levadura (una levadura recombinante), la introducción de un antígeno en una levadura, la adhesión física del antígeno a la levadura y la mezcla de la levadura y el antígeno juntos, tal como en un tampón u otra solución o formulación. Estos tipos de complejos se describen en detalle a continuación.

En una realización, se transforma una célula de levadura usada para preparar el vehículo de levadura con una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica el antígeno de modo que la proteína se expresa por la célula de levadura. Tal levadura también se menciona en el presente documento como levadura recombinante o un vehículo de levadura recombinante. La célula de levadura puede cargarse a continuación en la célula dendrítica como una célula intacta o la célula de levadura puede inactivarse o puede derivatizarse tal como por formación de esferoplastos, citoplastos, células vacías o partículas subcelulares de levadura, cualquiera de las cuales va seguida por la carga del derivado en la célula dendrítica. Los esferoplastos de levadura también pueden transfectarse directamente con una molécula de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, el esferoplasto se produce a partir de una levadura completa y se transfecta a continuación) para producir un esferoplasto recombinante que expresa un antígeno.

De acuerdo con la presente divulgación, una molécula de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico aislada, es una molécula o secuencia de ácido nucleico que se ha eliminado de su medio natural. Por tanto, "aislada" no refleja necesariamente el grado al que se ha purificado la molécula de ácido. Una molécula de ácido nucleico aislada útil para transfectar vehículos de levadura incluye ADN, ARN o derivados de ADN o ARN. Una molécula de ácido nucleico aislada puede ser monocatenaria o bicatenaria. Una molécula de ácido nucleico aislada útil en la presente divulgación incluye moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína o un fragmento de la misma, siempre que

el fragmento contenga al menos un epítipo útil en una composición de la presente invención.

Las moléculas de ácido nucleico transformadas en vehículos de levadura de la presente divulgación pueden incluir secuencias de ácido nucleico que codifican una o más proteínas o porciones de las mismas. Tales moléculas de ácido nucleico pueden comprender regiones codificantes parciales o completas, regiones reguladoras o combinaciones de las mismas. Una ventaja de las cepas de levadura es su capacidad de transportar varias moléculas de ácido nucleico y de ser capaces de producir varias proteínas heterólogas. Un número preferido de antígenos a producir por un vehículo de levadura de la presente divulgación es cualquier número de antígenos que puedan producirse razonablemente mediante un vehículo de levadura y típicamente varía de al menos uno hasta, al menos, aproximadamente 5 o más, siendo más preferidos de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 compuestos.

Un péptido o proteína codificada por una molécula de ácido nucleico dentro de un vehículo de levadura puede ser una proteína de longitud completa o puede ser una proteína funcionalmente equivalente en la que se han eliminado (por ejemplo, una versión truncada de la proteína), insertado, invertido, sustituido y/o derivatizado aminoácidos (por ejemplo, acetilado, glucosilado, fosforilado, unido por un anclaje de glicerofosfatidilinositol (GPI)) de modo que la proteína modificada tenga una función biológica sustancialmente similar a la de la proteína natural (o que tenga una función potenciada o inhibida en comparación con la proteína natural, si se desea). Las modificaciones se pueden lograr mediante técnicas conocidas en este campo que incluyen, pero sin limitación, modificación directa de la proteína o modificaciones de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína usando, por ejemplo, técnicas clásicas o recombinantes de ADN para lograr mutagénesis aleatoria o dirigida. Las proteínas funcionalmente equivalentes se pueden seleccionar usando ensayos que miden la actividad biológica de la proteína.

Se consigue la expresión de un antígeno en un vehículo de levadura de la presente divulgación usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. En resumen, se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno deseado en un vector de expresión de tal manera que la molécula de ácido nucleico se une de forma funcional a una secuencia de control de la transcripción para que pueda lograr la expresión constitutiva o regulada de la molécula de ácido nucleico cuando se utiliza para transformar una célula de levadura hospedadora. Las moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos pueden ser uno o más vectores de expresión unidos de forma funcional a una o más secuencias de control de la transcripción.

En una molécula recombinante de la presente divulgación, las moléculas de ácido nucleico se unen de forma funcional a vectores de expresión que contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula de levadura y que controlan la expresión de las moléculas de ácidos nucleicos. En particular, las moléculas recombinantes de la presente divulgación incluyen moléculas de ácido nucleico que están unidas de forma funcional a una o más secuencias de control de la transcripción. La expresión "unida de forma funcional" se refiere a unir una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la transcripción de una manera tal que la molécula puede expresarse cuando se introduce por transfección (es decir, se introduce por transformación, transducción o transfección) en una célula hospedadora.

Las secuencias de control de la transcripción, que pueden controlar la cantidad de proteína producida, incluyen secuencias que controlan el inicio, elongación y terminación de la transcripción. Son secuencias de control de la transcripción particularmente importantes aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tal como el promotor y las secuencias de activación cadena arriba. Se puede usar cualquier promotor de levadura adecuado en la presente divulgación y una diversidad de tales promotores son conocidos por los expertos en la materia. Los promotores preferidos para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, pero sin limitación, promotores de genes que codifican las siguientes proteínas de levadura: alcohol deshidrogenasa I (ADH1) o II (ADH2), CUP1, fosfoglicerato quinasa (PGK), triosa fosfato isomerasa (TPI), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; también mencionada como TDH3, para triosa fosfato deshidrogenasa), galactocinasa (GAL1), galactosa-1-fosfato uridil-transferasa (GAL7), UDP-galactosa epimerasa (GAL10), citocromo c_1 (CYC1), proteína Sec7 (SEC7) y fosfatasa ácida (PHO5), siendo los más preferidos los promotores híbridos tales como los promotores ADH2/GAPDH y CYC1/GAL10 y siendo, incluso, más preferido el promotor ADH2/GAPDH, que se induce cuando las concentraciones de glucosa en la célula son bajas (por ejemplo, de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 0,2 por ciento). Así mismo, se conocen varias secuencias de activación cadena arriba (UAS), también denominadas potenciadores. Las secuencias de activación cadena arriba para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, pero sin limitación, las UAS de genes que codifican las siguientes proteínas: PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 y GAL10, así como otras UAS activadas por el producto génico GAL4, siendo especialmente preferida la UAS de ADH2. Como la UAS de ADH2 se activa por el producto génico ADR1, es preferible sobreexpresar el gen de ADR1 cuando un gen heterólogo se une de forma funcional a la UAS de ADH2. Las secuencias de terminación de la transcripción preferidas para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen las secuencias de terminación de los genes de factor- α , GAPDH y CYC1.

Las secuencias de control de la transcripción preferidas para expresar genes en levaduras metiltróficas incluyen las regiones de control de la transcripción de los genes que codifican el alcohol oxidasa y la formiato deshidrogenasa.

- La transfección de una molécula de ácido nucleico en una célula de levadura de acuerdo con la presente divulgación puede conseguirse por cualquier método por el que pueda administrarse una molécula de ácido nucleico en la célula e incluye, pero sin limitación, difusión, transporte activo, sonicación en baño, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión de protoplastos. Las moléculas de ácido nucleico transfectadas pueden integrarse en un cromosoma de levadura o mantenerse en vectores extracromosómicos usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. En el presente documento se divulgan con detalle ejemplos de vehículos de levadura que portan dichas moléculas de ácido nucleico. Como se ha analizado anteriormente, también pueden producirse citoplastos de levadura, células vacías de levadura y extractos de membrana de levadura subcelular o fracciones de los mismos de forma recombinante transfectando microorganismos de levadura intactos o esferoplastos de levadura con moléculas de ácido nucleico deseadas, produciendo el antígeno en los mismos y, a continuación, manipulando adicionalmente los microorganismos o esferoplastos usando técnicas conocidas por los expertos en la materia para producir citoplastos, células vacías o extracto de membrana de levadura subcelular o fracciones de los mismos que contienen antígenos deseados.
- Las condiciones eficaces para la producción de vehículos de levadura recombinantes y la expresión del antígeno por el vehículo de levadura incluyen un medio eficaz en el que puede cultivarse una cepa de levadura. Un medio eficaz es típicamente un medio acuoso que comprende fuentes asimilables de carbohidrato, nitrógeno y fosfato, así como sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas y factores de crecimiento. El medio puede comprender nutrientes complejos o puede ser un medio mínimo definido. Las cepas de levadura de la presente divulgación pueden cultivarse en una diversidad de recipientes, incluyendo, pero sin limitación, biorreactores, matraces de Erlenmeyer, tubos de ensayo, placas de microvaloración y placas de Petri. El cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para la cepa de levadura. Dichas condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la materia (véase, por ejemplo, Guthrie *et al.* (eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego).
- En una realización de la presente divulgación, como una alternativa a la expresión de un antígeno de forma recombinante en el vehículo de levadura, un vehículo de levadura se carga intracelularmente con la proteína o antígeno peptídico o con carbohidratos u otras moléculas que sirven como un antígeno. Posteriormente, el vehículo de levadura, que ahora contiene el antígeno intracelularmente, puede administrarse al paciente o cargarse en un vehículo tal como una célula dendrítica (descrita a continuación). Como se usa en el presente documento, un péptido comprende una secuencia de aminoácidos de menos de o igual a aproximadamente 30-50 aminoácidos, mientras que una proteína comprende una secuencia de aminoácidos de más de aproximadamente 30-50 aminoácidos; las proteínas pueden ser multiméricas. Una proteína o péptido útil como antígeno puede ser tan pequeño como un epítipo de linfocitos T (es decir, más de 5 aminoácidos de longitud) y cualquier tamaño adecuado mayor que el que comprende múltiples epítopos, fragmentos de proteínas, proteínas de longitud completa, proteínas quiméricas o proteínas de fusión. Los péptidos y proteínas se pueden derivatizar de forma natural o sintética; tales modificaciones pueden incluir, pero sin limitación, glucosilación, fosforilación, acetilación, miristilación, prenilación, palmitoilación, amidación y/o adición de glucosilfosfatidil inositol. Los péptidos y proteínas pueden insertarse directamente en vehículos de levadura de la presente divulgación por técnicas conocidas por los expertos en la materia, tales como por difusión, transporte activo, fusión de liposomas, electroporación, fagocitosis, ciclos de congelación-descongelación y sonicación en baño. Los vehículos de levadura que pueden cargarse directamente con péptidos, proteínas, carbohidratos u otras moléculas incluyen levaduras intactas, así como esferoplastos, células vacías o citoplastos, que pueden cargarse con antígenos después de la producción, pero antes de cargarse en las células dendríticas. Como alternativa, la levadura intacta puede cargarse con el antígeno y, a continuación, pueden prepararse a partir de la misma esferoplastos, células vacías, citoplastos o partículas subcelulares. Puede cargarse cualquier número de antígenos en un vehículo de levadura en esta realización, desde, al menos 1, 2, 3, 4 o cualquier número entero hasta cientos o miles de antígenos, tal como se proporcionaría mediante la carga de un microorganismo, mediante la carga de una célula tumoral de mamífero o partes de la misma, por ejemplo.
- En otra realización de la presente divulgación, un antígeno se adhiere físicamente al vehículo de levadura. La adhesión física del antígeno al vehículo de levadura puede conseguirse por cualquier método adecuado en la técnica, incluyendo métodos de asociación covalente y no covalente que incluyen, pero sin limitación, reticulación química del antígeno a la superficie exterior del vehículo de levadura o unión biológica del antígeno a la superficie exterior del vehículo de levadura, tal como usando un anticuerpo u otro compañero de unión. La reticulación química puede conseguirse, por ejemplo, por métodos que incluyen unión de glutaraldehído, marcaje de fotoafinidad, tratamiento con carbodiimidas, tratamiento con agentes químicos que pueden unir enlaces disulfuro y tratamiento con otros agentes químicos reticulantes convencionales en la técnica. Como alternativa, puede ponerse en contacto un agente químico con el vehículo de levadura que altera la carga de la bicapa lipídica de la membrana de levadura o la composición de la pared celular de modo que la superficie exterior de la levadura tiene mayor probabilidad de fusionarse o unirse a antígenos que tienen características de carga particulares. También pueden incorporarse agentes de direccionamiento tales como anticuerpos, péptidos de unión, receptores solubles y otros ligandos a un antígeno como una proteína de fusión o asociarse de otro modo con el antígeno para la unión del antígeno al vehículo de levadura.
- En otra realización más, el vehículo de levadura y el antígeno se asocian entre sí por un mecanismo de unión más pasivo, no específico o no covalente, tal como por mezcla suave del vehículo de levadura y el antígeno juntos en un

tampón u otra formulación adecuada.

En una realización de la divulgación, se cargan tanto el vehículo de levadura como el antígeno de forma intracelular en un vehículo tal como una célula dendrítica o macrófago para formar la composición terapéutica o vacuna de la presente divulgación. Se analizan en detalle a continuación diversas formas en las que se puede conseguir la carga de ambos componentes. Como se usa en el presente documento, el término "cargado" y derivados del mismo se refieren a la inserción, introducción o entrada de un componente (por ejemplo, el vehículo de levadura y/o antígeno) en una célula (por ejemplo, una célula dendrítica). Cargar un componente intracelularmente se refiere a la inserción o introducción del componente en un compartimento intracelular de la célula (por ejemplo, a través de la membrana plasmática y, como mínimo, en el citoplasma, un fagosoma, un lisosoma o algún espacio intracelular de la célula). Para cargar un componente en una célula, se hace referencia a cualquier técnica mediante la cual el componente se fuerza a entrar a la célula (por ejemplo, mediante electroporación) o se coloca en un entorno (por ejemplo, en contacto con una célula o cerca de ella) donde es muy probable que el componente entre a la célula por algún proceso (p. ej., fagocitosis). Las técnicas de carga incluyen, pero sin limitación: difusión, transporte activo, fusión de liposomas, electroporación, fagocitosis y sonicación en baño. En una realización preferida, se usan mecanismos pasivos para cargar una célula dendrítica con el vehículo de levadura y/o antígeno, incluyendo tales mecanismos pasivos la fagocitosis del vehículo de levadura y/o antígeno por la célula dendrítica.

En una realización de la presente divulgación, una composición de vacuna también puede incluir compuestos modificadores de la respuesta biológica, o la capacidad de producir tales modificadores (es decir, mediante transfección con moléculas de ácido nucleico que codifican tales modificadores), aunque tales modificadores no son necesarias para lograr una respuesta inmunitaria robusta de acuerdo con la divulgación. Por ejemplo, un vehículo de levadura se puede transfectar con o cargar con al menos un antígeno y al menos un compuesto modificador de la respuesta biológica. Los modificadores de la respuesta biológica son compuestos que pueden modular respuestas inmunitarias. Ciertos modificadores de la respuesta biológica pueden estimular una respuesta inmunitaria protectora, mientras que otros pueden suprimir una respuesta inmunitaria dañina. Determinados modificadores de la respuesta biológica potencian preferentemente una respuesta inmunitaria mediada por células mientras que otros potencian preferentemente una respuesta inmunitaria humoral (es decir, pueden estimular una respuesta inmunitaria en la que hay un nivel aumentado de inmunidad celular en comparación con la inmunidad humoral, o viceversa). Hay varias técnicas conocidas por los expertos en la materia para medir la estimulación o supresión de las respuestas inmunitarias, así como para diferenciar las respuestas inmunitarias celulares de las respuestas inmunitarias humorales.

Los modificadores de respuesta biológica adecuados incluyen citoquinas, hormonas, derivados lipídicos, fármacos de molécula pequeña y otros moduladores del crecimiento, tales como, pero sin limitación, interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interferón gamma (IFN-gamma) factor de crecimiento I de tipo insulina (IGF-I), esteroides del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), prostaglandinas y leucotrienos. La capacidad de un vehículo de levadura para expresar (es decir, producir), y posiblemente secretar, IL-2, IL-12 y/o IFN-gamma potencia preferentemente la inmunidad mediada por células, mientras que la capacidad de un vehículo de levadura para expresar, y posiblemente secretar, IL-4, IL-5 y/o IL-10 potencia preferentemente la inmunidad humoral.

Los vehículos de levadura de la presente divulgación se pueden asociar con una amplia variedad de antígenos capaces de proteger a un animal de la enfermedad y se puede potenciar adicionalmente esta capacidad cargando el vehículo de levadura y el antígeno en una célula dendrítica o macrófago para formar una vacuna de la presente invención. Por consiguiente, el método de uso de la composición terapéutica o vacuna de la presente divulgación provoca preferentemente una respuesta inmunitaria en un animal de manera que el animal está protegido contra una enfermedad que es susceptible a la provocación de una respuesta inmunitaria, incluyendo cáncer y una enfermedad infecciosa. Como se usa en el presente documento, la expresión "protegido de una enfermedad" se refiere a la reducción de los síntomas de la enfermedad; la reducción de la aparición de la enfermedad y/o la reducción de la gravedad de la enfermedad. La protección de un animal puede referirse a la capacidad de una composición terapéutica de la presente invención, cuando se administra a un animal, para evitar que se produzca una enfermedad y/o para curar o para aliviar síntomas, signos o causas de la enfermedad. Por tanto, proteger a un animal de una enfermedad incluye tanto prevenir la aparición de la enfermedad (tratamiento profiláctico o vacuna profiláctica) como tratar a un animal que tiene una enfermedad o que está experimentando síntomas iniciales de una enfermedad (tratamiento terapéutico o una vacuna terapéutica). En particular, proteger a un animal de una enfermedad se logra provocando una respuesta inmunitaria en el animal induciendo una respuesta inmunitaria beneficiosa o protectora que puede, en algunos casos, suprimir adicionalmente (por ejemplo, reducir, inhibir o bloquear) una respuesta inmunitaria hiperactiva o dañina. El término, "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de la salud normal de un animal e incluye un estado cuando los síntomas de la enfermedad están presentes, así como las afecciones en las que se ha producido una desviación (por ejemplo, infección, mutación genética, defecto genético, etc.), pero los síntomas todavía no se han manifestado.

Más específicamente, una vacuna como se describe en el presente documento, cuando se administra a un animal por el método de la presente divulgación, produce preferentemente un resultado que puede incluir el alivio de la enfermedad (por ejemplo, reducción de al menos un síntoma o de la manifestación clínica de la enfermedad),

eliminación de la enfermedad, reducción de un tumor o lesión asociados con la enfermedad, eliminación de un tumor o lesión asociados con la enfermedad, prevención o alivio de una enfermedad secundaria como resultado de la aparición de una enfermedad primaria (p. ej., cáncer metastásico como resultado de un cáncer primario), prevención de la enfermedad y estimulación de la inmunidad de las células efectoras contra la enfermedad.

5 Los cánceres a tratar o prevenir usando el método divulgado en el presente documento y la composición de la presente invención incluyen, pero sin limitación, melanomas, carcinoma de células escamosas, cánceres de mama, carcinomas de cabeza y cuello, carcinomas de tiroides, sarcomas de tejidos blandos, sarcomas óseos, cánceres testiculares, cánceres de próstata, cánceres de ovario, cánceres de vejiga, cánceres de piel, cánceres cerebrales, angiosarcomas, hemangiosarcomas, tumores de mastocitos, cánceres hepáticos primarios, cánceres de pulmón, 10 cánceres pancreáticos, cánceres gastrointestinales, carcinomas de células renales, neoplasias hematopoyéticas y cánceres metastásicos de los mismos. Los cánceres particularmente preferidos para tratar con una composición terapéutica de la presente invención incluyen cánceres de pulmón primarios, cánceres metastásicos pulmonares, cánceres de cerebro primarios y cánceres de cerebro metastásicos. Un cáncer cerebral preferido para tratar incluye, pero sin limitación, 15 glioblastoma multiforme. Un cáncer de pulmón preferido para tratar incluye, pero sin limitación, carcinomas no microcíticos, carcinomas microcíticos y adenocarcinomas. Una composición terapéutica de la presente invención es útil para provocar una respuesta inmunitaria en un animal para tratar tumores que se pueden formar en tales cánceres, incluyendo tumores malignos y benignos. Preferentemente, la expresión del antígeno tumoral en un tejido de un animal que tiene cáncer produce un resultado seleccionado del grupo de alivio del cáncer, 20 reducción de un tumor asociado con el cáncer, eliminación de un tumor asociado con el cáncer, prevención del cáncer metastásico, prevención del cáncer y estimulación de la inmunidad de las células efectoras contra el cáncer.

Una ventaja particular de la presente invención es que la composición terapéutica no necesita ser administrada con un inmunopotenciador tal como un adyuvante o un vehículo, ya que la combinación de vehículo de levadura y 25 antígeno provoca una potente respuesta inmunitaria en ausencia de adyuvantes adicionales, que es de nuevo mejorada por la carga de estos componentes en una célula dendrítica, como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos número US20060104986, anteriormente citada. Esta característica, sin embargo, no excluye el uso de inmunopotenciadores en las composiciones de la presente invención. Por tanto, en una realización, una composición de la presente invención puede incluir uno o más adyuvantes y/o vehículos.

30 Los adyuvantes son típicamente sustancias que generalmente mejoran la respuesta inmunitaria de un animal a un antígeno específico. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund; otros componentes de la pared celular bacteriana; sales basadas en aluminio; sales basadas en calcio; sílice; polinucleótidos; toxoides; proteínas séricas; proteínas de la cubierta de virus; otras preparaciones derivadas de bacterias; interferón gamma; adyuvantes de copolímeros de bloques, como el adyuvante Titermax de Hunter (CytRx 35 TM, Inc. Norcross, GA); Adyuvantes Ribí (disponibles de Ribí ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT); y saponinas y sus derivados, tales como Quil A (disponible de Superfos Biosector A/S, Dinamarca).

40 Los vehículos son típicamente compuestos que aumentan la semivida de una composición terapéutica en el animal tratado. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, formulaciones poliméricas de liberación controlada, implantes biodegradables, liposomas, aceites, ésteres y glicoles.

45 Las composiciones terapéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, un excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a cualquier sustancia adecuada para suministrar una composición terapéutica útil en el método de la presente divulgación a un sitio adecuado *in vivo* o *ex vivo*. Los excipientes farmacéuticamente aceptables preferidos son capaces de mantener un vehículo de levadura (o una célula dendrítica que comprende el vehículo de levadura) en una forma que, al llegar el vehículo o célula de levadura a una célula, tejido o sitio en el cuerpo diana, el vehículo de levadura (asociado con un antígeno) o la célula dendrítica (cargada con un vehículo de levadura y antígeno), es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en el sitio diana (teniendo en cuenta que el sitio diana puede ser 50 sistémico). Los excipientes adecuados de la presente divulgación incluyen excipientes o formularios que transportan, pero no dirigen específicamente la vacuna a un sitio (también denominados en el presente documento vehículos no dirigidos). Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución de Hank, otras soluciones acuosas fisiológicamente equilibradas, aceites, ésteres y glicoles. Los 55 vehículos acuosos pueden contener sustancias auxiliares adecuadas requeridas para aproximarse a las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo, mejorando la estabilidad química y la isotonicidad.

60 Las sustancias auxiliares adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, lactato sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio y otras sustancias usadas para producir tampón fosfato, tampón Tris y tampón bicarbonato. Las sustancias auxiliares también pueden incluir conservantes, tal como timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcohol bencílico.

65 La presente divulgación incluye la administración de una composición o vacuna de la invención a un animal. El proceso de administración puede realizarse *ex vivo* o *in vivo*. La administración *ex vivo* se refiere a realizar parte de la etapa reguladora fuera del paciente, tal como administrar una composición de la presente invención a una

población de células (células dendríticas) retiradas de un paciente en condiciones tales que el vehículo de levadura y el antígeno se cargan en la célula y devolver las células al paciente. La composición terapéutica de la presente invención puede devolverse al paciente, o administrarse a un paciente, por cualquier modo adecuado de administración.

5 La administración de una vacuna o composición, que incluye una célula dendrítica cargada con el vehículo de levadura y el antígeno, puede ser sistémica, a la mucosa y/o proximal a la ubicación del sitio diana (por ejemplo, cerca de un tumor). Las vías preferidas de administración serán evidentes para los expertos en la materia, dependiendo del tipo de afección a prevenir o tratar, el antígeno usado y/o la población celular o tejido diana. Los
10 métodos de administración preferidos incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intranodal, administración intracoronaria, administración intraarterial (por ejemplo, en la arteria carótida), administración subcutánea, suministro transdérmico, administración intratraqueal, administración subcutánea, administración intraarticular, administración intraventricular, inhalación (por ejemplo, aerosol), administración intracraneal, intravertebral, intraocular, aural, intranasal, oral, pulmonar, impregnación de un catéter e inyección directa en un tejido. Las vías de administración particularmente preferidas
15 incluyen: intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intranodal, intramuscular, transdérmica, inhalada, intranasal, oral, intraocular, intraarticular, intracraneal e intravertebral. El suministro parenteral puede incluir vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intrapulmonar, intravenosa, subcutánea, por catéter en la aurícula y catéter venoso. El suministro aural puede incluir gotas para el oído, el suministro intranasal puede incluir gotas para la nariz o inyección intranasal y el suministro intraocular puede incluir colirios. El suministro por aerosol (inhalación) también puede realizarse usando métodos convencionales en la técnica, (véase, por ejemplo, Stribling
20 *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992). Por ejemplo, en una realización, se puede formular una composición o vacuna de la invención en una composición adecuada para administración nebulizada usando un dispositivo de inhalación o nebulizador adecuado. La administración oral puede incluir sólidos y líquidos que pueden tomarse por la boca y es útil en el desarrollo de la inmunidad de la mucosa y debido a que las composiciones que comprenden vehículos de levadura pueden prepararse fácilmente para la administración oral, por ejemplo, como comprimidos o cápsulas, así como formularse en productos alimentarios y bebidas. Otras vías de administración que modulan la inmunidad de la mucosa son útiles en el tratamiento de infecciones víricas, cánceres epiteliales, trastornos inmunosupresores y otras enfermedades que afectan a la región epitelial. Dichas vías incluyen la vía
25 bronquial, intradérmica, intramuscular, intranasal, otra vía de inhalación, rectal, subcutánea, tópica, transdérmica, vaginal y uretral.

Una vía de administración más preferida es cualquier vía de administración de una composición o vacuna al sistema respiratorio, incluyendo, pero sin limitación, inhalación, intranasal, intratraqueal y similares. Como se analizó
35 anteriormente y se muestra en los Ejemplos, los presentes inventores han demostrado que la administración de una vacuna de la divulgación por esta vía de administración proporciona resultados mejorados en comparación con al menos la administración subcutánea y parece ser particularmente eficaz para el tratamiento de cánceres cerebrales y cánceres de pulmón.

40 De acuerdo con la presente divulgación, un protocolo de administración eficaz (es decir, administrar una vacuna o composición terapéutica de manera eficaz) comprende parámetros de dosis y modos de administración adecuados que dan como resultado la provocación de una respuesta inmunitaria en un animal que tiene una enfermedad o afección, o que está en riesgo de contraer una enfermedad o afección, preferentemente para que el animal esté protegido de la enfermedad. Los parámetros de dosis eficaces se pueden determinar usando métodos
45 convencionales en la técnica para una enfermedad particular. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, determinación de las tasas de supervivencia, efectos secundarios (es decir, toxicidad) y progresión o regresión de la enfermedad. En particular, se puede determinar la eficacia de los parámetros de dosis de una composición terapéutica de la presente invención cuando se trata el cáncer evaluando las tasas de respuesta. Tales tasas de respuesta se refieren al porcentaje de pacientes tratados en una población de pacientes que responden con remisión parcial o completa. La remisión se puede determinar, por ejemplo, midiendo el tamaño del tumor o mediante examen microscópico de la presencia de células cancerosas en una muestra de tejido.

De acuerdo con la presente invención, un tamaño de dosis única adecuado es una dosis que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un animal cuando se administra una o más veces durante un
55 período de tiempo adecuado. Las dosis pueden variar dependiendo de la enfermedad o condición que se trate. En el tratamiento del cáncer, por ejemplo, una dosis única adecuada puede depender de si el cáncer que se está tratando es un tumor primario o una forma metastásica de cáncer. Un experto en la materia puede determinar fácilmente los tamaños de dosis únicos apropiados para la administración basándose en el tamaño de un animal y la vía de administración.

60 Una dosis única adecuada de una composición terapéutica o vacuna de la presente invención es una dosis que es capaz de proporcionar de forma eficaz un vehículo de levadura y un antígeno a un tipo celular, tejido o región dados del organismo del paciente en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, cuando se administra una o más veces durante un periodo de tiempo adecuado. Por ejemplo, en una realización,
65 una dosis única de un vehículo de levadura de la presente invención es de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^7 equivalentes de células de levadura por kilogramo de peso corporal del organismo al que

se está administrando la composición. Más preferentemente, una dosis única de un vehículo de levadura de la presente invención es de aproximadamente 0,1 Y.U. (1×10^6 células) a aproximadamente 100 Y.U. (1×10^9 células) por dosis (es decir, por organismo), incluyendo cualquier dosis intermedia, en incremento de $0,1 \times 10^6$ células (es decir $1,1 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$, $1,3 \times 10^6$...). Este intervalo de dosis puede usarse de manera eficaz en cualquier organismo de cualquier tamaño, incluyendo ratones, monos, seres humanos, etc. Cuando la vacuna se administra cargando el vehículo de levadura y el antígeno en células dendríticas, una dosis única preferida de una vacuna de la presente invención es de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ a aproximadamente 40×10^6 células dendríticas por individuo por administración. Preferentemente, una dosis única es de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 20×10^6 células dendríticas por individuo y, más preferentemente, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 10×10^6 células dendríticas por individuo. Los "potenciadores" de una composición terapéutica se administran preferentemente cuando la respuesta inmunitaria contra el antígeno ha menguado o cuando es necesario para proporcionar una respuesta inmunitaria o inducir una respuesta de memoria contra un antígeno o antígenos particulares. Los potenciadores se pueden administrar desde aproximadamente 2 semanas hasta varios años después de la administración original. En una realización, una pauta de administración es aquella en la que se administran de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^7 equivalentes de células de levadura de una composición por kg de peso corporal del organismo de aproximadamente una a aproximadamente 4 veces durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 6 meses.

Será obvio para un experto en la materia que el número de dosis administradas a un animal depende del alcance de la enfermedad y la respuesta de un paciente individual al tratamiento. Por ejemplo, un tumor grande puede requerir más dosis que un tumor más pequeño y una enfermedad crónica puede requerir más dosis que una enfermedad aguda. En algunos casos, sin embargo, un paciente que tiene un tumor grande puede requerir menos dosis que un paciente con un tumor más pequeño, si el paciente con el tumor grande responde más favorablemente a la composición terapéutica que el paciente con el tumor más pequeño. Por lo tanto, está dentro del alcance de la presente divulgación que un número adecuado de dosis incluye cualquier número requerido para tratar una enfermedad dada. En otro aspecto de la divulgación, el método de tratamiento de una enfermedad o afección tal como el cáncer se puede combinar con otros enfoques terapéuticos para mejorar la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, la administración de la vacuna de la presente invención puede producirse después de la resección quirúrgica de un tumor del animal. En otro aspecto, la administración de la vacuna se produce después de la resección quirúrgica de un tumor del animal y después de la administración de un trasplante alogénico no mieloablativo de células madre (analizado a continuación). En otro aspecto más, la administración de la vacuna de la presente invención se produce después de la resección quirúrgica de un tumor del animal, después de la administración de trasplante alogénico no mieloablativo de células madre y después de la infusión de linfocitos de donante alogénico.

Otra realización de la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente que tiene cáncer, que comprende: (a) tratar a un paciente que tiene cáncer mediante transferencia no mieloablativa de células madre eficaz para establecer un quimerismo mixto de médula ósea estable, en el que las células madre son proporcionadas por un donante alogénico; (b) administrar linfocitos obtenidos del donante alogénico al paciente; y (c) administrar al paciente, después de la etapa (b), una vacuna que comprende un vehículo de levadura y, al menos, un antígeno de cáncer. El proceso de establecer un quimerismo mixto de médula ósea estable a través de un trasplante alogénico no mieloablativo de células madre se ha descrito previamente en detalle en Luznik et al. (Sangre 101 (4): 1645-1652, 2003) y en otro lugar en la técnica (por ejemplo, Appelbaum *et al.*, 2001, Hematology pp. 62-86). En resumen, se trata a un paciente con irradiación corporal total no letal no mieloablativa e inmunosupresión (por ejemplo, combinación de radiación y quimioterapia) y se le administra una población de células que contienen células madre (por ejemplo, médula ósea) de un donante alogénico. Este tratamiento dará como resultado el establecimiento de un quimerismo mixto de médula ósea estable en el paciente receptor (es decir, existen tanto células inmunes del donante como del hospedador). En el protocolo de Luznik et al., al receptor se le proporciona a continuación una infusión de linfocitos del donante, seguido de una vacuna de células tumorales autólogas, una fuente de GM-CSF y una fuente de antígenos de histocompatibilidad. Este tratamiento dio como resultado una supervivencia libre de tumores a largo plazo de un número significativo de animales experimentales.

La presente divulgación proporciona una mejora al trasplante alogénico no mieloablativo de células madre y al protocolo de vacunación de células tumorales combinando el trasplante alogénico no mieloablativo de células madre con una estrategia de vacuna basada en levadura de la presente divulgación. Como se ejemplifica en el Ejemplo 5, el método de la presente divulgación es tan eficaz en el tratamiento de tumores como el protocolo de Luznik et al., pero no requiere el uso de antígenos tumorales autólogos del receptor, ni el uso de modificadores de respuesta biológica u otros adyuvantes (por ejemplo, el GM-CSF y fuente de antígenos de histocompatibilidad) según lo dispuesto en el protocolo anterior. El método modificado de la presente divulgación proporciona ventajas adicionales de permitir el uso de una amplia variedad de selecciones y combinaciones de antígenos muy específicos en la vacuna y de proporcionar una vacuna para un amplio espectro de pacientes con cáncer, mientras que el protocolo anterior, al utilizar células tumorales autólogas del receptor, está limitado eficazmente a ese paciente. La presente divulgación también proporciona la vacunación del donante de células madre y linfocitos con la vacuna basada en levadura, que puede expresar los mismos antígenos o antígenos ligeramente diferentes que la vacuna que se administrará al receptor, que se espera que mejore adicionalmente la eficacia de la vacuna.

En esta realización, la etapa de tratar a un paciente que tiene cáncer mediante transferencia no mieloablativa de células madre eficaz para establecer un quimerismo mixto de médula ósea estable, en el que las células madre son proporcionadas por un donante alogénico se realiza como se ha descrito bien en la técnica (por ejemplo, Luznik et al., *citado anteriormente*; Appelbaum et al., 2001, Hematology pp. 62-86). La infusión de linfocitos alogénicos de la etapa (b) puede realizarse por cualquier método adecuado, que incluye la recolección de linfocitos alogénicos a partir de sangre periférica del donante y la infusión en el paciente receptor, tal como mediante técnicas de ultrafiltración conocidas en este campo. Finalmente, al paciente se le administra la vacuna basada en levadura como se describe anteriormente en el presente documento. En un aspecto de esta realización, el método incluye adicionalmente administrar al donante, antes de la etapa (a), una vacuna que comprende un vehículo de levadura y, al menos, un antígeno de cáncer. En otro aspecto, el método incluye eliminar un tumor del paciente antes de realizar la etapa (a).

En el método de la presente divulgación, las vacunas y las composiciones terapéuticas se pueden administrar a cualquier miembro de la clase Vertebrados, Mamíferos, incluyendo, sin limitación, primates, roedores, ganado y mascotas domésticas. El ganado incluye mamíferos a consumir o que producen productos útiles (por ejemplo, ovejas para producción de lana). Los mamíferos preferidos para proteger incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, cabras, ovejas, ganado bovino, caballos y cerdos, siendo los seres humanos particularmente preferidos. De acuerdo con la presente divulgación, puede usarse el término "paciente" para describir cualquier animal que sea el sujeto de un tratamiento de diagnóstico, profiláctico o terapéutico como se describe en el presente documento.

Los siguientes resultados experimentales se proporcionan con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo demuestra la administración de una vacuna basada en levadura que comprende un antígeno de cáncer para el tratamiento de un carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) *in vivo*.

Las mutaciones Ras son comunes en los adenocarcinomas pulmonares de los seres humanos, ratones, ratas y hámsteres. De hecho, las mutaciones en la familia de proto-oncogenes ras son las mutaciones más comunes relacionadas con oncogenes en el cáncer humano y en tumores en animales experimentales. Los presentes inventores probaron si las vacunas basadas en levadura que ahora se han diseñado para dirigirse a mutaciones ras específicas de proteína mutante, pueden inducir respuestas inmunitarias productivas que conducen a la destrucción del tumor en modelos de adenocarcinoma de pulmón de ratón. El objetivo general de los experimentos fue establecer que tal vacuna podría usarse para combatir el cáncer de pulmón en humanos.

El modelo utilizado en los experimentos descritos en el presente documento es un modelo de ratón en el que los ratones A/J se inyectan con uretano (carbamato de etilo, que se metaboliza dando carbamato de vinilo, el presunto metabolito cancerígeno). Las hiperplasias se observan en aproximadamente 6 semanas, los tumores benignos en 8-10 semanas con los primeros signos de malignidad después de 8 meses. A los 10 meses, los tumores pueden ocupar todo el lóbulo pulmonar y a los 12 meses los ratones mueren por dificultad respiratoria. En este experimento, una única mutación de K-ras se expresa en las células tumorales, que está en el codón que codifica el resto de aminoácido en la posición 61 (también denominado codón 61).

Los presentes inventores han producido Ras61-VAX (Globelimmune), que es una cepa de levadura que se ha diseñado para expresar la proteína K-ras de ratón con una mutación en el codón 61 (con respecto a la secuencia K-ras de la SEQ ID NO: 5), que es la proteína K-ras mutante expresada en tumores de pulmón de ratón inducidos espontáneamente y líneas celulares de tumor de pulmón de ratón. Los animales inmunizados con Ras61-VAX dirigidos contra las mutaciones del codón 61 se probaron para determinar su capacidad para prevenir el desarrollo de tumores o reducir su tamaño después de la inducción en el modelo de inducción con uretano.

Los resultados demostraron que los animales inmunizados con Ras61-VAX muestran una protección significativa contra los tumores de pulmón preexistentes espontáneamente inducidos por la exposición al uretano en ratones. Tanto el número de tumores como el tamaño de los tumores se redujeron significativamente en los animales vacunados, en comparación con los animales control (Fig. 1). Estos resultados demuestran la viabilidad y la utilidad de la intervención terapéutica utilizando las presentes vacunas basadas en levadura de los presentes inventores que expresan proteínas K-ras mutantes para tratar y/o prevenir la enfermedad causada por un cáncer.

Además, la Fig. 2 muestra los resultados de un experimento en el que se inmunizaron ratones C57BL/6 por administración subcutánea de Ras61-VAX (Q61R solo) o por administración intranasal frente a subcutánea de una vacuna de levadura que expresa un Ras mutante que tiene dos mutaciones (RasV-VAX; G12V + Q61R, los días 1, 8, 22 y 36. Los ratones se expusieron a 10.000 células CMT64 por administración subcutánea el día 29, donde las células CMT64 expresan endógenamente una proteína mutante K-ras alterada en el aminoácido 12 de glicina a

valina (G12V). La Fig. 2 muestra el tamaño de los tumores en el día 59 (30 días después de la exposición) y el número de animales con tumores/número total de animales (por encima de la barra). Como se muestra en la Fig. 2, la administración de Ras61-VAX nuevamente proporcionó una protección mínima contra el crecimiento de tumores pulmonares (2 de 7 animales no tienen tumores) y la administración de RasV-Vax proporcionó protección inmunoterapéutica específica al reducir significativamente el volumen y el número de tumores (4 de 8 animales vacunados por vía subcutánea están libres de tumores y 7 de 8 animales vacunados por vía intranasal están libres de tumores). Sorprendentemente, la administración intranasal de la vacuna proporcionó resultados superiores en comparación con la administración subcutánea de la misma vacuna. Estos resultados destacaron la especificidad de la inmunoterapia molecular con los productos de vacuna basados en levadura. Estos estudios revelaron el requisito de que el rechazo inmunomediado del crecimiento tumoral dependía de la administración de vacunas basadas en levadura con el antígeno tumoral que albergaba el aminoácido mutado relevante.

Ejemplo 2

El siguiente ejemplo demuestra el uso de una vacuna basada en levadura que comprende un antígeno de cáncer para tratar un tumor cerebral *in vivo*.

En el siguiente experimento, se inmunizaron grupos de 5 ratones dos veces (día 0 y día 7) con la vacuna de expresión de proteína Gag (GI-VAX) o PBS (inyección simulada) mediante inyección subcutánea o administración intranasal, a continuación se expusieron el día 14 con tumores que expresaban la Proteína Gag. Los resultados de dos estudios independientes revelaron una supervivencia prolongada contra la exposición tumoral intracraneal en ratones que recibieron la vacuna por administración intranasal, en comparación con ratones inyectados de manera simulada y, sorprendentemente, en comparación con animales que recibieron la vacuna por vía subcutánea (Figura 3). La inmunización subcutánea protegió a los animales contra la exposición tumoral subcutánea (datos no mostrados). Estos resultados muestran que el método de la presente divulgación se puede usar eficazmente cuando se administra por vía intranasal y que la administración al tracto respiratorio puede ser eficaz para tumores intracraneales donde otras vías de administración no lo son.

Ejemplo 3

El siguiente ejemplo demuestra el uso de una vacuna basada en levadura que comprende un antígeno de cáncer humano (receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGFR) para tratar un melanoma y un tumor cerebral *in vivo*.

La capacidad de las estrategias inmunoterapéuticas para provocar respuestas inmunitarias protectoras depende de una serie de variables importantes. En primer lugar, la vacuna debe poder activar el sistema inmunitario para reconocer el antígeno diana, es decir, para proporcionar actividad "adyuvante". En el caso de la vacuna basada en levadura, los inventores habían demostrado previamente que la absorción de levadura en células dendríticas regulaba positivamente la expresión de la proteína MHC de clase I y clase II y desencadenaba la producción de citoquinas, que son las características distintivas de la actividad adyuvante (Stubbs y col., Nature Med (2001) 7, 625-629). El grado en que la levadura activa el sistema inmunitario "innato" fue equivalente al que se ve al usar lipopolisacáridos (LPS) derivados de las paredes celulares bacterianas. En segundo lugar, la vacuna debe promover la presentación en la superficie de los epítopos inmunodominantes de los antígenos diana al sistema inmunitario. Los inventores habían demostrado previamente que la vacuna basada en levadura es muy potente para administrar epítopos antigénicos para la estimulación de las respuestas mediadas por células (CTL) y humorales (anticuerpos) del sistema inmunitario (Stubbs et al, Nature Medicine (2001) 7, 625-629). En tercer lugar, y lo más importante, la estimulación del sistema inmunitario debe desencadenar respuestas inmunitarias en los sitios en el cuerpo donde se necesitan. Como se muestra a continuación, de forma sorprendente, la vía de administración de la vacuna parece influir en la eficacia de la respuesta inmunitaria contra tumores que se desarrollan en diferentes sitios del cuerpo.

Para probar la inmunogenicidad de una EGFR-tm VAX (una vacuna de levadura de la divulgación que expresa EGFR como el antígeno de cáncer), fue necesario modificar las células tumorales de glioma utilizadas en los experimentos de exposición. Se transfectaron células de melanoma de ratón B16 y células de tumor de glioma de rata 9L para expresar EGFR humano (células B16-E y células 9L-E, respectivamente). La línea celular 9L-E clonada se clasificó a continuación para células que expresan niveles altos, intermedios o bajos de EGFRh. Las células B16-E y las células 9L-E poseen, por lo tanto, el antígeno incluido en la vacuna de levadura (es decir, EGFR humano) y proporcionan un modelo sustituto apropiado para gliomas humanos que presentan expresión alterada de EGFR en las células malignas. El objetivo de los estudios era demostrar que el vehículo de administración basado en levadura desencadenaba la inmunidad protectora contra la exposición con una dosis letal de células de glioma 9L-E implantadas intracranealmente en ratas.

Las células B16-E y las células 9L-E se clonaron hasta la homogeneidad y se demostró que expresaban EGFR humano, como se ensayó mediante citometría de flujo. Para garantizar que la expresión heteróloga de la proteína EGFR humana no daba como resultado el rechazo inmunitario de los tumores en ausencia de administración de vacuna, se determinó en primer lugar que la B16-E transfectada era capaz de formar tumores subcutáneos en ratones (datos no mostrados). Las células 9L-E transfectadas formaron tumores por vía subcutánea e intracraneal en ratas (datos no mostrados). A continuación se estableció la etapa para probar la eficacia de la vacuna de levadura

EGFR-tm VAX para proteger a los animales contra la exposición tumoral B16-E en ratones y la exposición tumoral 9L-E en ratas.

5 Se diseñaron estudios preliminares de exposición de vacunas para determinar si la vacunación subcutánea con EGFR-tm VAX es eficaz para proteger a los animales frente a la exposición con una dosis letal de las células tumorales de melanoma B16-E implantadas por vía subcutánea. Este enfoque representa una de las medidas estándar de los inventores para la utilidad de un nuevo antígeno tumoral diana para que sea eficaz para provocar la destrucción de células tumorales. Este estudio demostró que los animales vacunados con EGFR-tm VAX están protegidos contra la exposición tumoral B16-E (4/6 animales no tienen tumores), en comparación con los animales inmunizados de manera simulada (1/6 animales no tienen tumores) (datos no mostrados). Estos resultados validan que EGFR sirve como un antígeno apropiado para provocar respuestas inmunitarias mediadas por células y que la vacuna EGFR-tm desencadena respuestas inmunitarias protectoras contra la exposición tumoral. Por lo tanto, el siguiente paso fue probar la eficacia de EGFR-tm VAX contra la exposición intracraneal con gliomas 9L-E en ratas.

15 Los inventores también demostraron en el experimento anterior que la vacuna basada en levadura, cuando se administra por vía intranasal (i.n), proporciona una protección equivalente a la inmunización subcutánea de la vacuna contra la exposición tumoral de melanoma subcutánea (datos no mostrados). Por lo tanto, el siguiente experimento probó si el producto EGFR-VAX inmunoterapéutico basado en levadura, que se demostró que provocaba respuestas inmunitarias protectoras contra una exposición al tumor de melanoma B16 subcutáneo, proporcionaría protección inmunoterapéutica contra una exposición tumoral intracraneal.

25 La eficacia de EGFR-tm VAX y el impacto de la vía de administración se analizaron adicionalmente por exposición intracraneal con células tumorales de glioma en el modelo de rata. Los animales (8 animales por grupo) se inmunizaron con ~ 20 millones de células de levadura que expresaban EGFRh (EGFR-vax) o levadura (vector solo) por vía intranasal (i.n.) o subcutánea (s.c.) los días 0, 7, 21. Los animales inmunizados fueron expuestos por administración intracraneal de 1.250 células del glioma de rata 9L no transfectado (9L solo) o 9L que expresaba EGFRh. Los pesos corporales de las ratas se monitorizaron diariamente, donde la pérdida de peso corporal era indicativa de mortalidad animal inminente.

30 Los resultados (Fig. 4) demostraron que el 50% de los animales inmunizados con levadura EGFR-VAX estaban completamente protegidos contra la exposición tumoral intracraneal letal con el glioma 9L de rata que expresaba el antígeno tumoral, pero ninguno de los animales rechazó el crecimiento de tumores que carecían del antígeno tumoral (es decir, la vacuna induce inmunidad específica de antígeno). Además, los animales inmunizados con EGFR-VAX restantes que sucumbieron a la exposición letal demostraron un tiempo de supervivencia prolongado en comparación con los animales de control.

35 Además, la mejora estadísticamente significativa en la supervivencia de los animales que se inmunizaron por vía intranasal en comparación con la subcutánea es intrigante y sorprendente y reproduce los datos que se describieron anteriormente (véase el Ejemplo 2) con respecto a la protección contra la exposición tumoral intracraneal (melanoma) en ratones.

45 Debido a que este modelo de exposición tumoral intracraneal de rata se considera que refleja más estrechamente el glioma humano, los datos positivos con estos estudios proporcionan datos preclínicos excelentes para pasar a un ensayo clínico. Los estudios adicionales pueden incluir el intervalo de dosis, las pautas, los estudios de resección quirúrgica y la reexposición de los supervivientes de 9L-E con tumores 9L para examinar si el sistema inmunitario está ahora "educado" con respecto a los antígenos tumorales adicionales (desconocidos) en los gliomas 9L, así como la prueba de vehículos de levadura que expresan la proteína mutante EGFR-VIII, y establecerán una base para comenzar a fabricar un producto de vacuna de grado clínico.

50 Los datos descritos anteriormente indican que aunque múltiples vías de inmunización pueden ser eficaces para destruir tumores en la periferia, las vacunas basadas en levadura usadas de la presente divulgación son particularmente eficaces para cebar células efectoras que pueden ser únicas para el pulmón. Debido a que la vacuna basada en levadura puede cebar precursores únicos de células efectoras, las células inmunitarias activadas por inmunización intranasal pueden ser particularmente eficaces para cruzar la barrera hematoencefálica para influir en el curso del crecimiento tumoral intracraneal. Por lo tanto, la vía de inmunización puede ser un componente crítico y no apreciado previamente en el diseño de una vacuna basada en levadura eficaz para tumores cerebrales. Debido a que la vacuna basada en levadura es extremadamente fácil para múltiples vías de inmunización, la vacuna ofrece la esperanza de provocar de forma exclusiva respuestas inmunitarias altamente especializadas con un potencial hasta ahora poco apreciado para el tratamiento de algunos cánceres.

60 **Ejemplo 4**

El siguiente ejemplo demuestra el uso de una vacuna basada en levadura que comprende un antígeno de cáncer para tratar cáncer renal *in vivo*.

65 En 2001, el cáncer de células renales (CCR) se diagnosticará en aproximadamente 31.800 personas en los Estados

Unidos, con 11.600 muertes; lo que representa del 2 al 3 por ciento de todos los cánceres y el 2 por ciento de todas las muertes por neoplasmas. Aunque los pacientes tradicionalmente presentan la triada de hematuria, masa abdominal, dolor y pérdida de peso, menos pacientes actualmente diagnosticados tienen estos síntomas debido a la mayor frecuencia de diagnóstico accidental. Muchos pacientes son diagnosticados con una enfermedad que, aunque potencialmente curable mediante cirugía, reincidirá porque las células ya han alcanzado el sistema vascular. Además, la terapia para el CCR metastásico es extremadamente limitada. Los enfoques hormonales y quimioterapéuticos producen tasas de respuesta <10% y ningún cambio apreciable en la supervivencia. Sin embargo, ha existido un interés desde hace mucho tiempo en el uso del tratamiento inmunológico para la enfermedad. Además de los raros casos de regresión espontánea, tanto el interferón α como la interleucina-2 han mostrado actividad "significativa" con una minoría definida de pacientes que respondieron al tratamiento, algunos con remisiones completas. Aunque hay pocos ensayos prospectivos aleatorizados, un resumen reciente del Grupo de Trabajo sobre Citoquinas documentó una tasa de respuesta completa del 8% y una tasa de respuesta global del 25% a altas dosis de IL-2 en comparación con aproximadamente la mitad de la tasa de respuesta con IL-2/interferón- α subcutánea ambulatoria. En su conjunto, al tiempo que muestran claramente la actividad contra el CCR, los enfoques utilizados hasta la fecha carecen de especificidad tanto para la enfermedad como para la potencia.

Más del 60% de los CCR tienen mutaciones de inactivación en VHL, que parecen actuar como un gen "guardián" para el CCR, análogo al papel de APC en el cáncer de colon. La proteína codificada por VHL es un componente esencial de un complejo de ligamiento con ubiquitina E3 (SCF), conocido como VHL/elonginCB/Cul-2 (VCB), que se dirige a proteínas particulares para su destrucción por el proteosoma 26S. Debido a que muchas mutaciones de VHL dan como resultado proteínas de sentido erróneo o de desplazamiento de fase, se generarán nuevos epítomos que deberían reconocerse como antígenos específicos de tumor. Los siguientes experimentos probaron la hipótesis de que las proteínas VHL mutantes en CCR pueden ser dirigidas para respuestas inmunitarias después de la incorporación a una nueva vacuna basada en levadura de la presente divulgación.

No hay tumores mediados por VHL mutados comparables en ratones. Por lo tanto, los presentes inventores usaron la secuencia de VHL humana conocida (SEQ ID NO: 16) así como la VHL de ratón clonada (SEQ ID NO: 17) para preparar construcciones de expresión que codifican secuencias de VHL murinas que son de tipo salvaje o portan dos mutaciones específicas que afectan a Y98 o R167 (con respecto a la secuencia murina de la SEQ ID NO: 17). Las mutaciones en estas dos posiciones corresponden a los puntos calientes que se encuentran con frecuencia en los tumores humanos. La tirosina 98 forma un sitio de unión expuesto en la superficie para las dianas de VHL tales como HIF1 α , mientras que la arginina 167 es importante para la estabilización de la hélice alfa H1. Ambos restos están significativamente expuestos al disolvente y es probable que sean accesibles para el reconocimiento del sistema inmunitario. Tal como se muestra en la comparación de BLAST más adelante, las secuencias de aminoácidos de VHL humanas y murinas son casi idénticas desde la posición 58 a la 190, incluyendo estos dos puntos calientes.

58		Tyrosine98	117
hVHL:	RPRPVLRSVNSREPSQVIFCNRS	PRVVL	PVWLNFDGEPQPYPTLPPGTGRR
mVHL:	RPRPVLRSVNSREPSQVIFCNRS	PRVVL	PLWLNFDGEPQPYPI
24			83
118		Arginine167	177
hVHL:	LFRDAGTHDGLLVNQTELFVPSL	NVDGQPIFANITLPVYTLKERCLQVV	RSLVKPENYRR
mVHL:	LFRDAGTHDGLLVNQTELFVPSL	NVDGQPIFANITLPVYTLKERCLQVV	RSLVKPENYRR
84			143
178		211	
hVHL:	LDIVRSLYEDLEDHPNVQKDLERLTQERIAHQRM		SEQ ID NO:16
mVHL:	LDIVRSLYEDLEDYPSVRKDIQRLSQEHLESQHL		SEQ ID NO:17
144		177	

Por lo tanto, los resultados obtenidos con estas construcciones murinas proporcionan una estimación razonablemente precisa de la eficacia en CCR humano. Y98 se muta con mayor frecuencia en histidina, mientras que R167 generalmente se muta a glutamina o triptófano. R167 también se ve afectado por las mutaciones de desplazamiento de fase; una inserción de un único resto G dentro del codón R167 generará un nuevo péptido con fase desplazada (REPSQA) seguido de un codón de terminación (TGA). Los presentes inventores generaron tanto una mutación de histidina sin sentido en Y98 (Y98H) como una mutación de desplazamiento de fase en R167 (R167fr) para crear proteínas de VHL mutantes potencialmente inmunogénicas que recapitulan las características de las mutaciones de VHL conocidas. La proteína VHL con fase desplazada expresará un nuevo epítomo más grande y, por lo tanto, puede ser más inmunogénica. La única mutación sin sentido de Y98H será una prueba más rigurosa de este enfoque, ya que implica un único cambio de aminoácido. Estas mutaciones se introdujeron en la secuencia de mVHL de longitud completa usando tanto un protocolo de mutagénesis específica de sitio como PCR. En resumen, la mutación R133 se creó usando cebadores de PCR específicos para introducir la mutación y el codón de terminación prematuro. Este mutante, así como VHL de tipo salvaje (WT), se clonó en el vector de expresión de

levadura, pYEX-BX utilizado para la expresión de levadura y en un vector de expresión de mamífero pUP para transfección y expresión en células de melanoma. La mutación puntual Y64 se creó utilizando un protocolo de mutagénesis específico de sitio de Clontech que ha demostrado éxito previo.

5 Los insertos se clonaron en el vector de expresión de levadura pYEX-BX y en el vector de expresión de mamífero pUP para transfección y expresión en células de melanoma. Para conseguir este objetivo, los inventores diseñaron levaduras para expresar la proteína VHL y probaron la eficacia de las diversas formulaciones de vacuna en ratones. El plásmido pYEX-BX contiene un promotor inducible por cobre que permitirá la inducción controlada de la proteína VHL murina después de la transformación de *S. cerevisiae*.

10 Los vectores de expresión que albergan los genes VHL bajo el control del promotor temprano constitutivo de CMV se transfectaron en células de melanoma B16. Las líneas celulares crecieron *in vitro* y crecieron como tumores cuando se inyectaron en ratones, lo que confirma que las construcciones de VHL mutadas no eran inmunogénicas por sí mismas o de otro modo letales para las células transfectadas. El primer experimento de vacunación/exposición a un tumor consistió en dieciocho ratones C57B6 de 6 semanas de edad inmunizados mediante inyección subcutánea el día 0 y el día 7 con 20×10^6 levaduras que expresan el mutante de truncamiento R133 (VHLtrunc). En el día 14, los ratones fueron expuestos con tumor por inyección subcutánea de la siguiente manera: 6 ratones recibieron $2,5 \times 10^4$ B16 no transfectadas; 6 ratones recibieron $2,5 \times 10^4$ B16 que expresaban VHLwt; 6 ratones recibieron $2,5 \times 10^4$ B16 que expresaban VHL VHLtrunc. Los ratones se evaluaron para determinar el crecimiento tumoral 21 días después de la exposición. Los resultados de este experimento se ilustran en la Tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Inmunización	Exposición Tumoral	Crecimiento tumoral (n.º ratones con tumores)
mVHLtrunc VAX	B16	5/6
mVHLtrunc VAX	B16 VHLwt	5/6
mVHLtrunc VAX	B16 VHLtrunc	0/6

25 Estos resultados mostraron que, mientras que la vacuna VHLtrunc (dirigida a unos 9 aminoácidos únicos antes del truncamiento) proporcionó protección contra la exposición al tumor B16 VHL tMut, la vacuna no protegió a los ratones expuestos con VHLwt B16 o B16 no transfectadas. Por lo tanto, el protocolo de vacunación induce una potente respuesta inmunitaria, pero esta respuesta puede limitarse solamente al antígeno contra el que se vacunaron los animales. Sin embargo, debido a que este mutante truncado genera una gran diferencia de secuencia con respecto a VHL de tipo salvaje, es posible que una mutación más sutil (es decir, solo un resto) pueda producir una respuesta inmunitaria tanto al tipo mutante como al tipo salvaje.

30 En un segundo experimento de inmunización/exposición (Tabla 2), los ratones se inmunizaron con la vacuna VHL de tipo salvaje (mVHLwtVAX) o con la vacuna VHL mutante truncada descrita anteriormente (mVHLtrunc VAX). Los ratones se dividieron en grupos y se expusieron a B16 no transfectadas, expresando las B16 VHL de tipo salvaje o expresando las B16 VHL mutada, como se describe en el primer experimento anteriormente. Los resultados mostraron que, de nuevo, la inmunización con la vacuna VHL truncada dio como resultado la protección contra la exposición tumoral y, de nuevo, confirmaron que estos ratones no estaban protegidos contra la exposición con tumor de tipo salvaje. Los ratones inmunizados con el tumor de tipo salvaje no estaban protegidos contra la exposición al tumor de tipo salvaje, lo que indica que la vacuna no rompió la tolerancia a la proteína de tipo salvaje. Sin embargo, cuando se expusieron con el tumor mutante que expresaba VHL, el 50% de los ratones inmunizados con proteína de tipo salvaje estaban protegidos, lo que indica que el VHL mutado fue reconocido en cierta medida por el sistema inmunitario murino. Dada la especificidad y eficacia de la vacuna basada en levadura en estos experimentos, será una tarea relativamente simple generar levaduras dirigidas a las mutaciones más comunes en humanos, allanando el camino para un posible enfoque de inmunización como una vacuna terapéutica en humanos.

45

TABLA 2

Inmunización	Exposición Tumoral	Crecimiento tumoral (n.º ratones con tumores)
Simulado	B16	3/3
	B16 VHLwt	3/3
	B16 VHLtrunc	2/3
mVHLwt VAX	B16	5/6
	B16 VHLwt	5/6
	B16 VHLtrunc	3/6
mVHLtrunc VAX	B16	5/6
	B16 VHLwt	4/5
	B16 VHLtrunc	0/6

Ejemplo 5

El siguiente ejemplo demuestra el uso de una vacuna basada en levadura que comprende un antígeno de cáncer para tratar cáncer de mama *in vivo*.

5 La mayoría de los pacientes con cánceres en estadio temprano de órganos sólidos, incluyendo pulmón, mama y colon, se pueden curar mediante la extirpación quirúrgica del tumor primario. Desafortunadamente, muchos pacientes presentan recaídas o metástasis hematógenas que, con raras excepciones, no se pueden curar con las modalidades actualmente disponibles, incluyendo cirugía, radioterapia, quimioterapia o trasplante de células madre alogénicas (alloSCT). Así mismo, aunque las vacunas de cáncer de ingeniería más recientes muestran una potencia significativa en modelos animales de enfermedad recientemente establecida, una vez que el tumor se ha establecido por más de 5 días o se han producido metástasis, las vacunas son generalmente ineficaces como agentes únicos (Borello et al., 2000, Blood 95:3011-3019) Esto se debe en parte a que el establecimiento del tumor se asocia típicamente con la inducción de tolerancia a antígenos tumorales, que debe romperse para lograr una terapia exitosa (Ye et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:3916-3920); Staveley-O'Carroll et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1178-1183). La vacunación después de alloSCT mieloablatoivo ha producido mejoras incrementales, pero todavía no puede afectar a los tumores establecidos durante más de 3 días (Anderson et al., 2000, Blood 95:2426-2433). Luznik et al., *citado anteriormente*, informó recientemente en un modelo de cáncer de mama de ratón que la vacunación después de un protocolo de trasplante alogénico no mieloablatoivo de células madre (NST) que logra un quimerismo mixto estable de la médula ósea genera respuestas inmunitarias específicas de tumor significativamente mejoradas capaces de eliminar metástasis 2 semanas después del establecimiento del tumor primario sin inducir enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). La eficacia significativamente mejorada de esta estrategia en relación con la vacunación sola o la vacunación después de un SCT autólogo o de un alloSCT completo depende de la acción del sistema inmunitario tanto del hospedador como del donante, que interactúan en el contexto del quimerismo mixto.

En los experimentos de Luznik et al., la vacuna que se administró consistía en células tumorales autólogas irradiadas mezcladas con factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En el siguiente experimento, los presentes inventores demostraron que una vacuna basada en levadura podría sustituir el uso de células tumorales autólogas irradiadas mezcladas con células que producen GM-CSF en el mismo modelo animal con resultados igualmente eficaces. En resumen, los presentes inventores generaron una vacuna basada en levadura compuesta de levadura *Saccharomyces cerevisiae* transducida con un vector de expresión de levadura que codifica la proteína gp70 del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) bajo el control del promotor CUP1 (Yeast gp70-IT). La proteína gp70 se expresa en cánceres de mama espontáneos que surgen en ratones Balb/c que están infectados con MMTV. Siguiendo el protocolo descrito por Luznik et al., se inyectaron ratones Balb/c por vía subcutánea con 10.000 células tumorales 4T1 (células de cáncer de mama espontáneas derivadas de Balb/c que expresan MMTV gp70) en el día 0. Se reseco el tumor subcutáneo el día 13, antes del trasplante alogénico no mieloablatoivo de células madre (NST) de donantes B10.D2 compatibles con el MHC. El NST consistió en 200 cGy TBI el día 13, 10 millones de células de médula donante por vía intravenosa el día 14 y ciclofosfamida 200 mg/Kg por vía intraperitoneal el día 17. Los ratones que recibieron médula de B10.D2 recibieron a continuación: (a) 20 millones de esplenocitos B10.D2 el día 28 sin tratamiento adicional (sin vacuna); (b) 20 millones de esplenocitos B10.D2 el día 28 más vacuna tumoral autóloga el día 31 (10^6 células tumorales 4T1 irradiadas mezcladas con 5 H 10^5 B78H1/GM-CSF, un secretor de GM-CSF, una línea celular inespecífica MHC-negativa), o (c) 20 millones de esplenocitos B10.D2 en el día 28 más la vacuna basada en levadura gp70-IT de la presente divulgación el día 31. Como se ve fácilmente en la Fig. 5, la vacuna basada en levadura de la presente divulgación indujo protección contra la recidiva tumoral fatal indistinguible de la protección inducida por células tumorales autólogas que producen GM-CSF. La utilidad clínica del enfoque de la vacuna basada en levadura de la presente divulgación, en comparación con el uso de células tumorales autólogas del paciente mezcladas con una línea celular inespecífica que produce GM-CSF, debe ser fácilmente apreciada, e incluye, pero sin limitación, las ventajas de la aplicabilidad más amplia del paciente, la reducida variabilidad de los resultados, la capacidad mejorada de diseñar el antígeno de vacunación, la seguridad mejorada, la falta de necesidad de incluir modificadores biológicos tales como GM-CSF en la vacuna, etc.

Ejemplo 6

El siguiente ejemplo demuestra el uso de una vacuna basada en levadura que comprende un antígeno de cáncer para tratar un melanoma *in vivo*.

En este experimento, haciendo referencia a la Tabla 3, se usaron 5 grupos de 5 ratones cada uno. En el Grupo A, los ratones recibieron inyecciones de PBS 4 semanas y 2 semanas antes de la exposición tumoral y de 50×10^6 vacunas basadas en levadura hMART-1 (vehículo de levadura que expresa MART-1 humano) los días 10 y 17 después de la exposición tumoral. En el Grupo B, los ratones recibieron inyecciones de 50×10^6 vacunas basadas en levadura hMART-1 4 semanas y 2 semanas antes de la exposición al tumor y a los 10 y 17 días después de la exposición al tumor. Los ratones del grupo C recibieron PBS 4 semanas y 2 semanas antes de la exposición tumoral y ninguna administración después de la exposición al tumor. Los ratones del grupo D recibieron inyecciones de 50×10^6 vacunas hMART-1 basadas en levadura 4 semanas y 2 semanas antes de la exposición al tumor y ninguna

administración después de la exposición al tumor. Los ratones del Grupo E recibieron 50×10^6 vacunas basadas en levadura de EGFR (vehículos de levadura que expresan EGFR) 4 semanas y 2 semanas antes de la exposición al tumor y ninguna administración después de la exposición al tumor. En el día 0, todos los ratones recibieron una exposición tumoral de células de melanoma D16 administradas por vía subcutánea. Los ratones en los Grupos A - D recibieron 50.000 células de melanoma D16, que expresaron MART-1 de ratón endógeno (las células no se transfectaron con MART-1 humano) y los ratones en el Grupo E recibieron 50.000 células de melanoma D16 que se habían transfectado con EGFR.

TABLA 3

Vacunación hMART-1					
	-4semanas	-2semanas	0	D10	D17
A (5)	PBS	PBS	50K B16	2-8 OD	2-8 OD
B (5)	20D	2OD	50K B16	2OD	2OD
C (5)	PBS	PBS	50K B16		
D (5)	2OD	2OD	50K B16		
E (5)	2OD EGFR	2OD EGFR	25-50K B16/EGFR		

Los resultados se muestran en la Fig. 6. Los ratones en grupos B (inmunizados tanto antes como después de la exposición tumoral) y D (inmunizados antes de la exposición tumoral) mostraron una reducción significativa en la carga tumoral, demostrando que la vacuna de levadura que expresa un antígeno de melanoma es eficaz contra tumores de melanoma, incluso entre especies.

Ejemplo 7

El siguiente ejemplo demuestra la construcción de proteínas de fusión para la expresión en un vehículo de levadura de la divulgación, en el que las proteínas de fusión comprenden múltiples dominios inmunogénicos y múltiples mutaciones del mismo antígeno.

La secuencia de nucleótidos y aminoácidos para una variedad de miembros de la familia Ras son bien conocidas en la técnica. La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de ácido nucleico que codifica K-ras humano (también conocida en GenBank con número de registro NM_033360). La SEQ ID NO: 2 codifica K-ras humano, representada en el presente documento como SEQ ID NO:3. La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de ácido nucleico que codifica K-ras murino (también conocida en GenBank con número de registro NM_021284). La SEQ ID NO: 4 codifica K-ras murino, representada en el presente documento como SEQ ID NO:5. La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ácido nucleico que codifica H-ras humano (también conocida en GenBank con número de registro NM_005343). La SEQ ID NO: 6 codifica H-ras humano, representada en el presente documento como SEQ ID NO:7. La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de ácido nucleico que codifica H-ras murino (también conocida en GenBank con número de registro NM_008284). La SEQ ID NO: 8 codifica H-ras murino, representada en el presente documento como SEQ ID NO:9. La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de ácido nucleico que codifica N-ras humano (también conocida en GenBank con número de registro NM_002524). La SEQ ID NO: 10 codifica N-ras humano, representada en el presente documento como SEQ ID NO:11. La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de ácido nucleico que codifica N-ras murino (también conocida en GenBank con número de registro NM_010937). La SEQ ID NO: 12 codifica N-ras humano, representada en el presente documento como SEQ ID NO:13.

La Fig. 7 es un dibujo esquemático que ilustra ejemplos de proteínas de fusión que comprenden múltiples dominios antigénicos/inmunogénicos para su uso en una vacuna basada en levadura de la presente divulgación. En estas construcciones de fusión ejemplares, se usaron las posiciones de aminoácido 2-165 de una proteína K-Ras (posiciones 2-165 de la SEQ ID NO: 3), que también son aminoácidos equivalentes en N-Ras y H-Ras (es decir, uno podría usar las posiciones 2-165 de N-Ras o H-Ras y lograr el mismo resultado). Esta secuencia se mutó a continuación en la posición 12 para sustituir un resto de valina, cisteína o ácido aspártico por la glicina que normalmente se produce en esta posición (véanse GI-4014, GI-4015 y GI-4016, respectivamente) y en la posición 61 para sustituir una arginina para la glutamina que normalmente se produce en esta posición. Una segunda secuencia se fusionó a (se unió a) esta secuencia. La segunda secuencia es un dominio de K-ras que abarca las posiciones de aminoácidos 56-67 de la SEQ ID NO: 3, que incluye una mutación en la posición 61 para sustituir el resto de glutamina que normalmente existe en esa posición por una leucina. Aunque estas tres primeras secuencias se muestran con el dominio Q61L fusionado al extremo N de la secuencia más larga, se han producido otras construcciones en las que se invierte el orden de los dominios. El nucleótido y la secuencia de aminoácidos traducida para la construcción que codifica GI-4014 están representados por las SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente.

La Fig. 7 también muestra una vacuna de fusión Ras multiantígeno (GI-4018), que contiene las tres mutaciones de la posición 12 descritas anteriormente y ambas mutaciones de la posición 61 descritas anteriormente. La proteína de fusión se construyó de la siguiente manera. Una secuencia sintética que comprende la SEQ ID NO: 1 está seguida por cuatro polipéptidos que incluyen diversas mutaciones Ras. El primero de los cuatro representados en la Fig. 7 incluye los restos 3-30 del extremo N-terminal de K-Ras (SEC ID NO: 3), en el que el resto de aminoácido en la

posición 12 con respecto a la SEC ID NO: 3 se ha mutado por sustitución de la glicina que existe naturalmente en esta posición por una valina. El segundo de los cuatro dominios incluye los restos de aminoácido 3-39 de la SEQ ID NO: 3), en donde el resto de aminoácido en la posición 12 con respecto a la SEQ ID NO: 3 se ha mutado por sustitución de la glicina que existe naturalmente en esta posición por una cisteína. El tercero de los cuatro dominios
 5 consiste en las posiciones de aminoácido 3-165 de la SEQ ID NO: 3), que contiene una sustitución de la glicina que normalmente existe en la posición 12 por un ácido aspártico y una sustitución de la glutamina que normalmente existe en la posición 61 por una arginina. El cuarto de los cuatro dominios es un dominio de K-ras que abarca las posiciones de aminoácido 56-69 de la SEQ ID NO: 3, que incluye una mutación en la posición 61 para sustituir el resto de glutamina que normalmente existe en esa posición por una leucina. De nuevo, aunque los dominios se
 10 representan en este orden en la Fig. 7, se debe entender que se puede reorganizar el orden de los dominios como se desee.

Este ejemplo simplemente pretende ser ilustrativo de cómo pueden construirse construcciones de antígeno útiles en la presente divulgación. Se pueden usar estrategias similares para otros antígenos usando dominios de diferentes antígenos, dominios múltiples del mismo antígeno o dominios repetidos con diferentes mutaciones. Este tipo de construcción es particularmente útil cuando es deseable abarcar varias mutaciones diferentes y/o combinaciones de mutaciones que pueden producirse en una única posición en el antígeno en la naturaleza, en una única construcción de vacuna.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Franzusoff, Alex
 Bellgrau, Donald

25 <120> Vacunas basadas en Levadura como Inmunoterapia

<130> 3923-6-PCT

30 <150> 60/434.163
 <151> 16/12/2002

<160> 17

35 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> péptido

45 <400> 1

Met Ala Asp Glu Ala Pro
 1 5

50 <210> 2
 <211> 570
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(570)
 <223>

<400> 2

ES 2 672 319 T3

```

atg act gaa tat aaa ctt gtg gta gtt gga gct ggt ggc gta ggc aag      48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1          5          10          15

agt gcc ttg acg ata cag cta att cag aat cat ttt gtg gac gaa tat      96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
          20          25          30

gat cca aca ata gag gat tcc tac agg aag caa gta gta att gat gga      144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
          35          40          45

gaa acc tgt ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt caa gag gag tac      192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
          50          55          60

agt gca atg agg gac cag tac atg agg act ggg gag ggc ttt ctt tgt      240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65          70          75          80

gta ttt gcc ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat      288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
          85          90          95

aga gaa caa att aaa aga gtt aag gac tct gaa gat gta cct atg gtc      336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
          100          105          110

cta gta gga aat aaa tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac aca aaa      384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
          115          120          125

cag gct cag gac tta gca aga agt tat gga att cct ttt att gaa aca      432
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
          130          135          140

tca gca aag aca aga cag aga gtg gag gat gct ttt tat aca ttg gtg      480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145          150          155          160

agg gag atc cga caa tac aga ttg aaa aaa atc agc aaa gaa gaa aag      528
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys
          165          170          175

act cct ggc tgt gtg aaa att aaa aaa tgc att ata atg taa          570
Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met
          180          185

```

5 <210> 3
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

ES 2 672 319 T3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
 85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys
 165 170 175

Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met
 180 185

5 <210> 4
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(567)
 <223>

15 <400> 4

ES 2 672 319 T3

atg act gag tat aaa ctt gtg gtg gtt gga gct ggt ggc gta ggc aag	48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys	
1 5 10 15	
agc gcc ttg acg ata cag cta att cag aat cac ttt gtg gat gag tac	96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr	
20 25 30	
gac cct acg ata gag gac tcc tac agg aaa caa gta gta att gat gga	144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly	
35 40 45	
gaa acc tgt ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt caa gag gag tac	192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr	
50 55 60	
agt gca atg agg gac cag tac atg aga act ggg gag ggc ttt ctt tgt	240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys	
65 70 75 80	
gta ttt gcc ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat	288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr	
85 90 95	
aga gaa caa att aaa aga gta aag gac tct gaa gat gtg cct atg gtc	336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val	
100 105 110	
ctg gta ggg aat aag tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac acg aaa	384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys	
115 120 125	
cag gct cag gag tta gca agg agt tac ggg att ccg ttc att gag acc	432
Gln Ala Gln Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr	
130 135 140	
tca gca aag aca aga cag ggt gtt gac gat gcc ttc tat aca tta gtc	480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val	
145 150 155 160	
cga gaa att cga aaa cat aaa gaa aag atg agc aaa gat ggg aag aag	528
Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys	
165 170 175	
aag aag aag aag tca agg aca agg tgt aca gtt atg tga	567
Lys Lys Lys Lys Ser Arg Thr Arg Cys Thr Val Met	
180 185	

<210> 5
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 5

5

ES 2 672 319 T3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125

Gln Ala Gln Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
165 170 175

Lys Lys Lys Lys Ser Arg Thr Arg Cys Thr Val Met
180 185

<210> 6
<211> 570
5 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(570)
<223>

<400> 6

ES 2 672 319 T3

atg acg gaa tat aag ctg gtg gtg gtg ggc gcc ggc ggt gtg ggc aag 48
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

agt gcg ctg acc atc cag ctg atc cag aac cat ttt gtg gac gaa tac 96
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

gac ccc act ata gag gat tcc tac cgg aag cag gtg gtc att gat ggg 144
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

gag acg tgc ctg ttg gac atc ctg gat acc gcc ggc cag gag gag tac 192
 Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

agc gcc atg cgg gac cag tac atg cgc acc ggg gag ggc ttc ctg tgt 240
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

gtg ttt gcc atc aac aac acc aag tct ttt gag gac atc cac cag tac 288
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
 85 90 95

agg gag cag atc aaa cgg gtg aag gac tcg gat gac gtg ccc atg gtg 336
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

ctg gtg ggg aac aag tgt gac ctg gct gca cgc act gtg gaa tct cgg 384
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
 115 120 125

cag gct cag gac ctc gcc cga agc tac ggc atc ccc tac atc gag acc 432
 Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
 130 135 140

tcg gcc aag acc cgg cag gga gtg gag gat gcc ttc tac acg ttg gtg 480
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

cgt gag atc cgg cag cac aag ctg cgg aag ctg aac cct cct gat gag 528
 Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
 165 170 175

agt ggc ccc ggc tgc atg agc tgc aag tgt gtg ctc tcc tga 570
 Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
 180 185

<210> 7
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

ES 2 672 319 T3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
 85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
 115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
 130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
 165 170 175

Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
 180 185

<210> 8
 <211> 570
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(570)
 <223>

10

<400> 8

ES 2 672 319 T3

atg aca gaa tac aag ctt gtg gtg gtg ggc gct gga ggc gtg gga aag 48
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

agt gcc ctg acc atc cag ctg atc cag aac cac ttt gtg gac gag tat 96
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

gat ccc act ata gag gac tcc tac cgg aaa cag gtg gtc att gat ggg 144
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

gag aca tgt cta ctg gac tac tta gac aca gca ggt caa gaa gag tat 192
 Glu Thr Cys Leu Leu Asp Tyr Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

agt gcc atg cgg gac cag tac atg cgc aca ggg gag ggc ttc ctc tgt 240
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

gta ttt gcc atc aac aac acc aag tcc ttc gag gac atc cat cag tac 288
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
 85 90 95

agg gag cag atc aag cgg gtg aaa gat tca gat gat gtg cca atg gtg 336
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

ctg gtg ggc aac aag tgt gac ctg gct gct cgc act gtt gag tct cgg 384
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
 115 120 125

cag gcc cag gac ctt gct cgc agc tat ggc atc ccc tac att gaa aca 432
 Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
 130 135 140

tca gcc aag acc cgg cag ggc gtg gag gat gcc ttc tat aca cta gtc 480
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

cgt gag att cgg cag cat aaa ttg cgg aaa ctg aac cca ccc gat gag 528
 Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
 165 170 175

agt ggt cct ggc tgc atg agc tgc aaa tgt gtg ctg tcc tga 570
 Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
 180 185

<210> 9
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 9

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

10

ES 2 672 319 T3

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

<210> 10
 <211> 570
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <221> CDS
 <222> (1)..(570)
 <223>

<400> 10

ES 2 672 319 T3

atg act gag tac aaa ctg gtg gtg gtt gga gca ggt ggt gtt ggg aaa 48
 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

agc gca ctg aca atc cag cta atc cag aac cac ttt gta gat gaa tat 96
 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

gat ccc acc ata gag gat tct tac aga aaa caa gtg gtt ata gat ggt 144
 Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

gaa acc tgt ttg ttg gac ata ctg gat aca gct gga caa gaa gag tac 192
 Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

agt gcc atg aga gac caa tac atg agg aca ggc gaa ggc ttc ctc tgt 240
 Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

gta ttt gcc atc aat aat agc aag tca ttt gcg gat att aac ctc tac 288
 Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
 85 90 95

agg gag cag att aag cga gta aaa gac tcg gat gat gta cct atg gtg 336
 Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

cta gtg gga aac aag tgt gat ttg cca aca agg aca gtt gat aca aaa 384
 Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125

caa gcc cac gaa ctg gcc aag agt tac ggg att cca ttc att gaa acc 432
 Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140

tca gcc aag acc aga cag ggt gtt gaa gat gct ttt tac aca ctg gta 480
 Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

aga gaa ata cgc cag tac cga atg aaa aaa ctc aac agc agt gat gat 528
 Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
 165 170 175

ggg act cag ggt tgt atg gga ttg cca tgt gtg gtg atg taa 570
 Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
 180 185

<210> 11
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

ES 2 672 319 T3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125

Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175

Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 12
<211> 582
5 <212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(582)
<223>

<400> 12

ES 2 672 319 T3

atg act gag tac aaa ctg gtg gtg gtt gga gca ggt ggt gtt ggg aaa	48
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys	
1 5 10 15	
agc gcc ctg acg atc cag cta atc cag aac cac ttt gtg gat gaa tat	96
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr	
20 25 30	
gat ccc acc ata gag gat tct tac cga aag caa gtg gtg att gat ggt	144
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly	
35 40 45	
gag acc tgc ctg ctg gac ata ctg gac aca gct gga caa gag gag tac	192
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr	
50 55 60	
agt gcc atg aga gac cag tac atg agg aca ggc gaa ggg ttc ctc tgt	240
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys	
65 70 75 80	
gta ttt gcc atc aat aat agc aaa tca ttt gca gat att aac ctc tac	288
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr	
85 90 95	
agg gag caa att aag cgt gtg aaa gat tct gat gat gtc ccc atg gtg	336
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val	
100 105 110	
ctg gta ggc aac aag tgt gac ttg cca aca agg aca gtt gac aca aag	384
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys	
115 120 125	
caa gcc cac gaa ctg gcc aag agt tac gga att cca ttc att gag acc	432
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr	
130 135 140	
tca gcc aag acc cga cag ggt gtg gag gat gcc ttt tac aca ctg gta	480
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val	
145 150 155 160	
agg gag ata cgc cag tac cga ttg aaa aag ctc aac agc agt gac gat	528
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp	
165 170 175	
ggc act caa ggt tgt atg ggg tcg ccc tgt gtg ctg atg tgt aag aca	576
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Ser Pro Cys Val Leu Met Cys Lys Thr	
180 185 190	
ctt tga	582
Leu	

<210> 13
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 13

ES 2 672 319 T3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
 85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
 115 120 125

Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
 130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
 165 170 175

Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Ser Pro Cys Val Leu Met Cys Lys Thr
 180 185 190

Leu

5 <210> 14
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(534)
 <223>

<400> 14

ES 2 672 319 T3

```

atg gtc ctc gac aca gca ggt ttg gag gag tac agt gca atg act gag      48
Met Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Thr Glu
1                               5                               10                               15

tat aaa ctt gtg gtg gtt gga gct gtt ggc gta ggc aag agc gcc ttg      96
Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
                               20                               25                               30

acg ata cag cta att cag aat cac ttt gtg gat gag tac gac cct acg     144
Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr
                               35                               40                               45

ata gag gac tcc tac agg aaa caa gta gta att gat gga gaa acc tgt     192
Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys
                               50                               55                               60

ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt cga gag gag tac agt gca atg     240
Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met
65                               70                               75                               80

agg gac cag tac atg aga act ggg gag ggc ttt ctt tgt gta ttt gcc     288
Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala
                               85                               90                               95

ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat aga gaa caa     336
Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr Arg Glu Gln
                               100                              105                              110

att aaa aga gta aag gac tct gaa gat gtg cct atg gtc ctg gta ggg     384

Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val Leu Val Gly
                               115                               120                               125

aat aag tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac acg aaa cag gct cag     432
Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys Gln Ala Gln
                               130                               135                               140

gag tta gca agg agt tac ggg att ccg ttc att gag acc tca gca aag     480
Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys
145                               150                               155                               160

aca aga cag ggt gtt gac gat gcc ttc tat aca tta gtc cga gaa att     528
Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val Arg Glu Ile
                               165                               170                               175

cga aaa
Arg Lys                                                                534

```

<210> 15
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 15

5

ES 2 672 319 T3

Met Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Thr Glu
 1 5 10 15

Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
 20 25 30

Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr
 35 40 45

Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys
 50 55 60

Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met
 65 70 75 80

Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala
 85 90 95

Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr Arg Glu Gln
 100 105 110

Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val Leu Val Gly
 115 120 125

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

Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys
 145 150 155 160

Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val Arg Glu Ile
 165 170 175

Arg Lys

<210> 16
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16

5

ES 2 672 319 T3

Arg Pro Arg Pro Val Leu Arg Ser Val Asn Ser Arg Glu Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Val Ile Phe Cys Asn Arg Ser Pro Arg Val Val Leu Pro Val Trp Leu
 20 25 30

Asn Phe Asp Gly Glu Pro Gln Pro Tyr Pro Thr Leu Pro Pro Gly Thr
 35 40 45

Gly Arg Arg Ile His Ser Tyr Arg Gly His Leu Trp Leu Phe Arg Asp
 50 55 60

Ala Gly Thr His Asp Gly Leu Leu Val Asn Gln Thr Glu Leu Phe Val
 65 70 75 80

Pro Ser Leu Asn Val Asp Gly Gln Pro Ile Phe Ala Asn Ile Thr Leu
 85 90 95

Pro Val Tyr Thr Leu Lys Glu Arg Cys Leu Gln Val Val Arg Ser Leu
 100 105 110

Val Lys Pro Glu Asn Tyr Arg Arg Leu Asp Ile Val Arg Ser Leu Tyr
 115 120 125

Glu Asp Leu Glu Asp His Pro Asn Val Gln Lys Asp Leu Glu Arg Leu
 130 135 140

Thr Gln Glu Arg Ile Ala His Gln Arg Met
 145 150

<210> 17
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 17

5

ES 2 672 319 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica que comprende:

- 5 a) una levadura completa; y
 b) una proteína de fusión expresada por la levadura, comprendiendo la proteína de fusión:
- 10 i) al menos un antígeno proteico o dominio inmunogénico del mismo seleccionado del grupo que consiste en: un antígeno de cáncer, un antígeno vírico y un antígeno bacteriano; y
 ii) un péptido unido al extremo N del antígeno proteico o dominio inmunogénico del mismo, consistiendo el péptido en una secuencia de aminoácidos de M-A-D-E-A-P (SEQ ID NO: 1).

2. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno es un antígeno de un patógeno de enfermedad infecciosa seleccionado entre un antígeno vírico o un antígeno bacteriano.

3. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el antígeno es un antígeno vírico.

4. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el antígeno vírico se selecciona de: antígeno de superficie y antígeno central del VHB; gag, env, rev, tar, tat, proteínas de la nucleocápside y transcriptasa inversa de virus de inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH, VIF); antígenos de VHC; proteínas de la nucleocápside de la gripe; proteínas de la nucleocápside de la parainfluenza; proteínas E6 y E7 de papiloma humano de tipo 16; LMP-1, LMP-2 y EBNA-2 de virus de Epstein-Barr; LAA o glucoproteína D de herpes.

5. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el antígeno vírico se selecciona de: HBsAg, HBcAg, gag de VIH-1, antígeno central de hepatitis c, env de VIH-1, pol de VIH-1, tat de VIH-1, nef de VIH-1, E6 y E7 de HPV o glucoproteína D de VHS.

6. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno es un antígeno de cáncer.

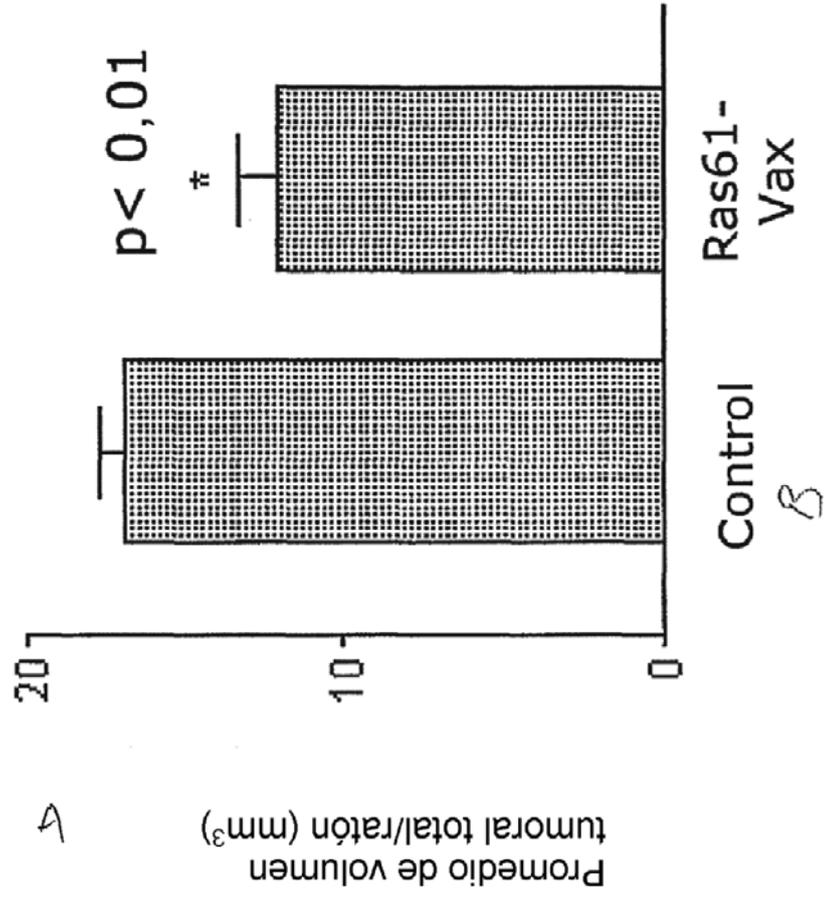
7. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el antígeno de cáncer se selecciona de: Ras, CEA, EGF-R, Muc-1, PSA, BCR-abl, MAGE, NY-ESO-1, gp100, tirosinasa, PMSA, HER2/neu, hTERT, MARTI, TRP-1, TRP-2, formas oncogénicas mutantes de p53 (TP53), p73, BRAF, APC (poliposis adenomatosa coli), myc, VHL (proteína de von Hippel Lindau), Rb-1 (retinoblastoma), Rb-2, BRCA1, BRCA2, AR (receptor de andrógenos), Smad4, MDR1 o Flt-3.

8. La composición terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la levadura es una levadura muerta completa.

9. La composición terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la levadura es de *Saccharomyces cerevisiae*.

10. La composición terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

Fig. 1



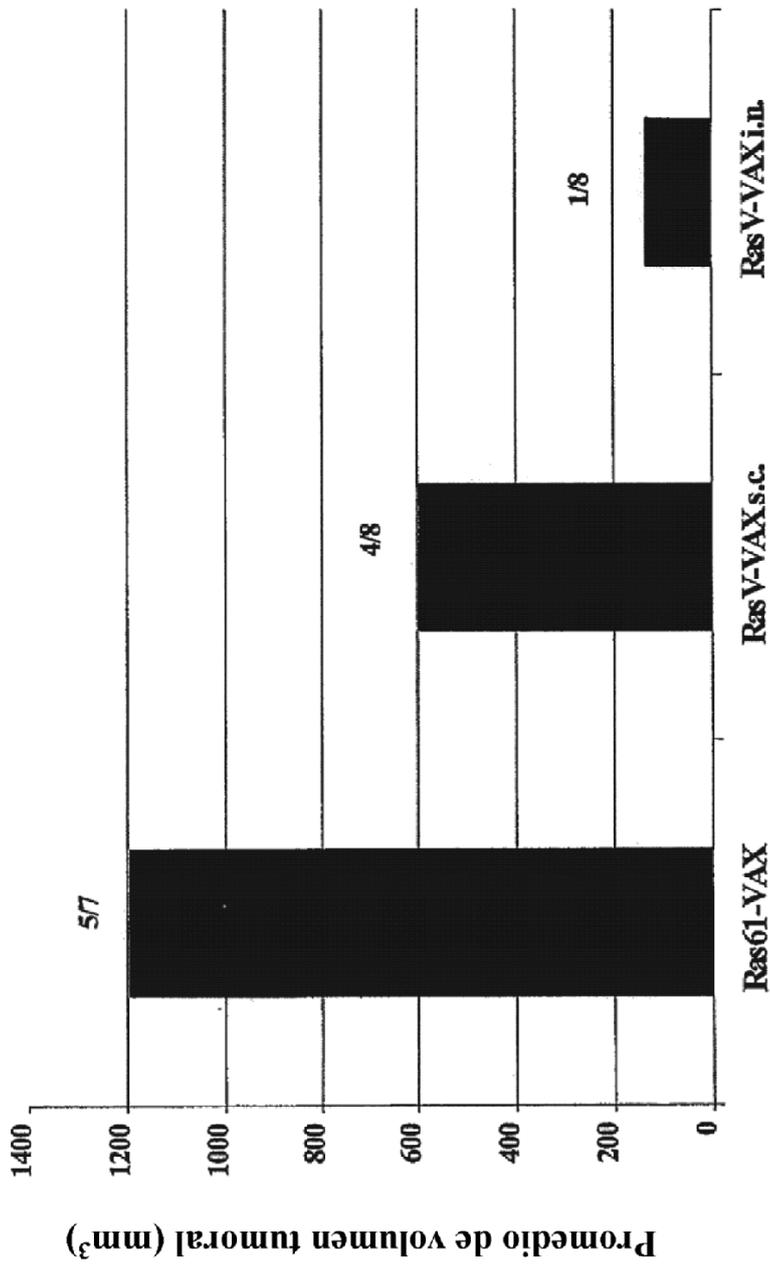


Fig. 2

Fig. 3

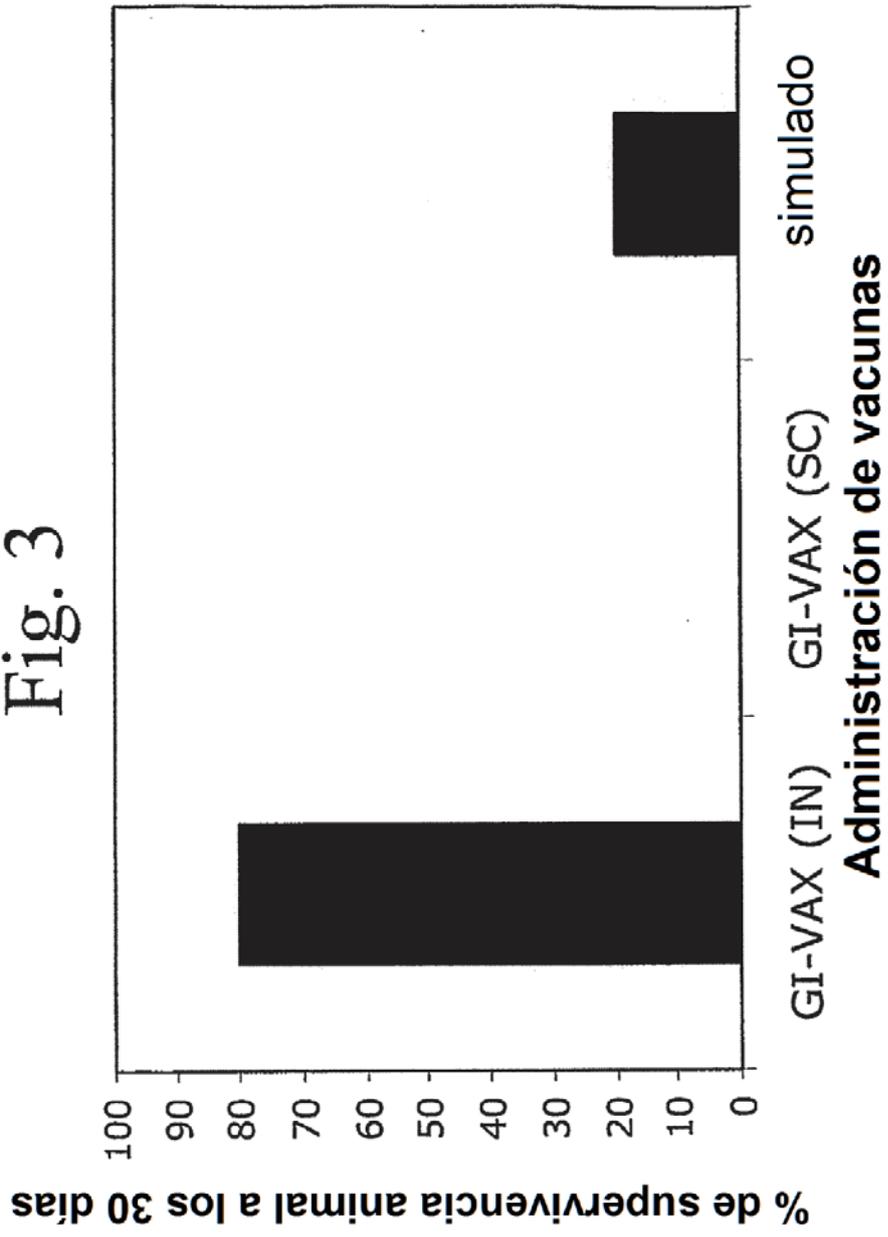


Fig. 4

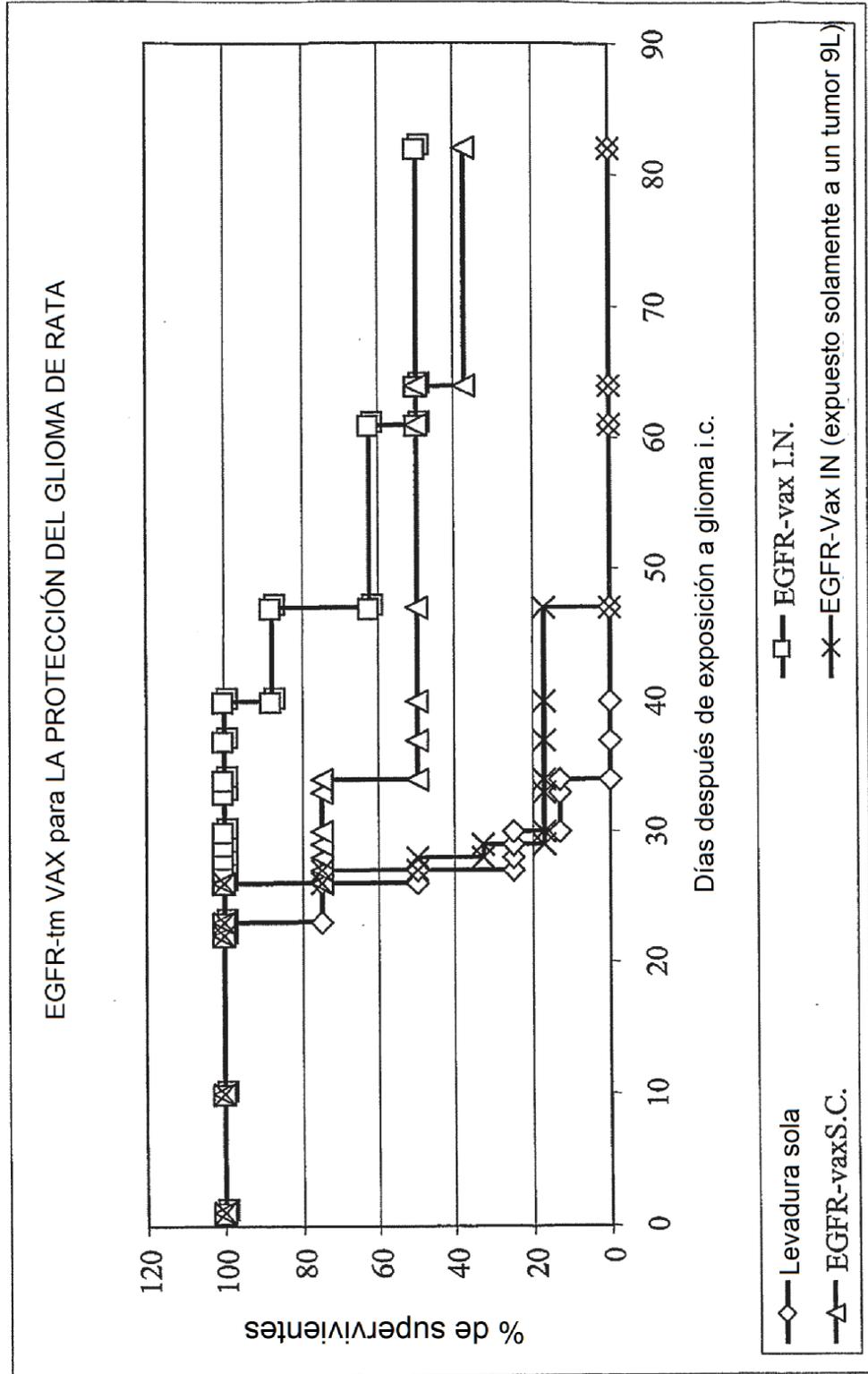


Fig. 5

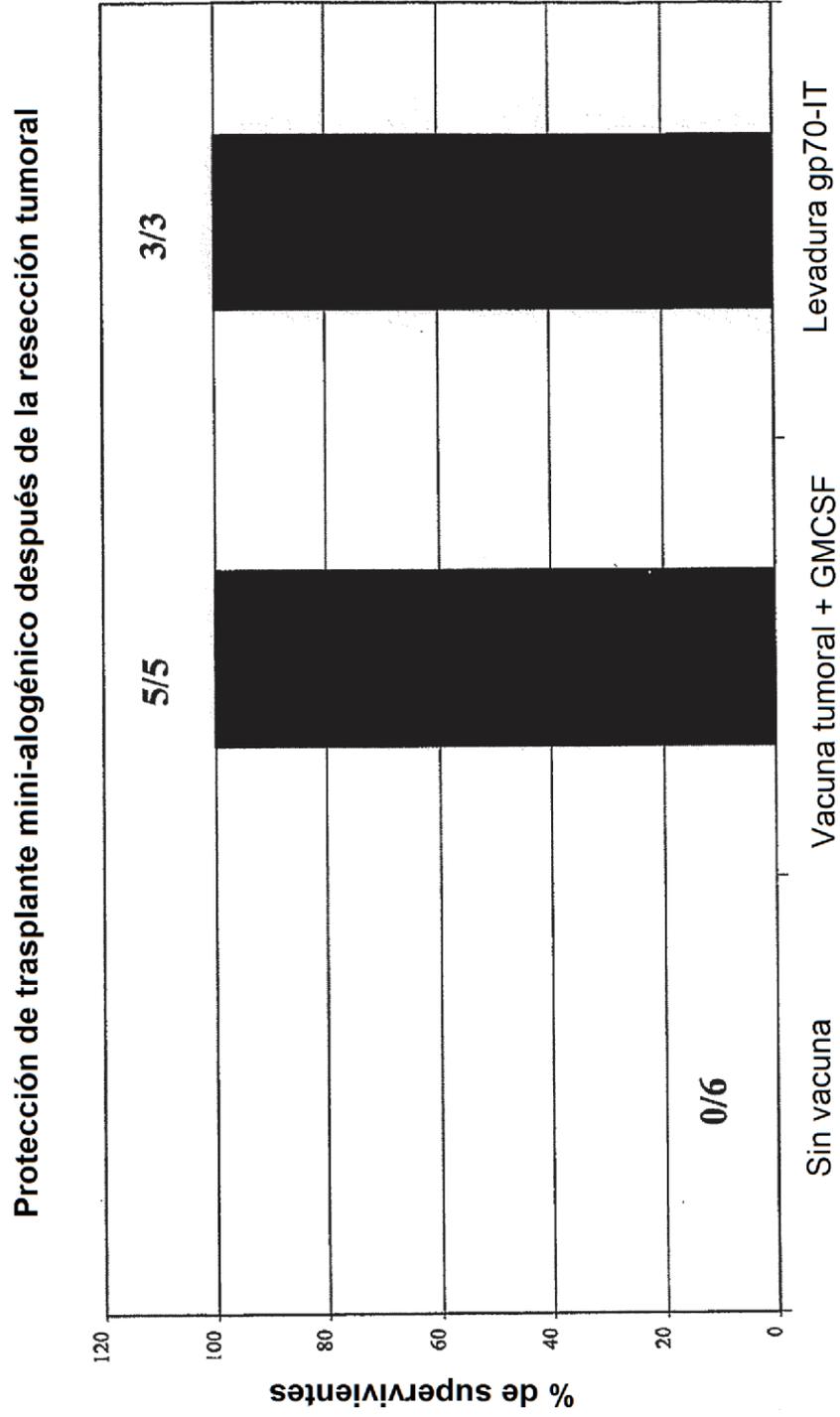


Fig. 6

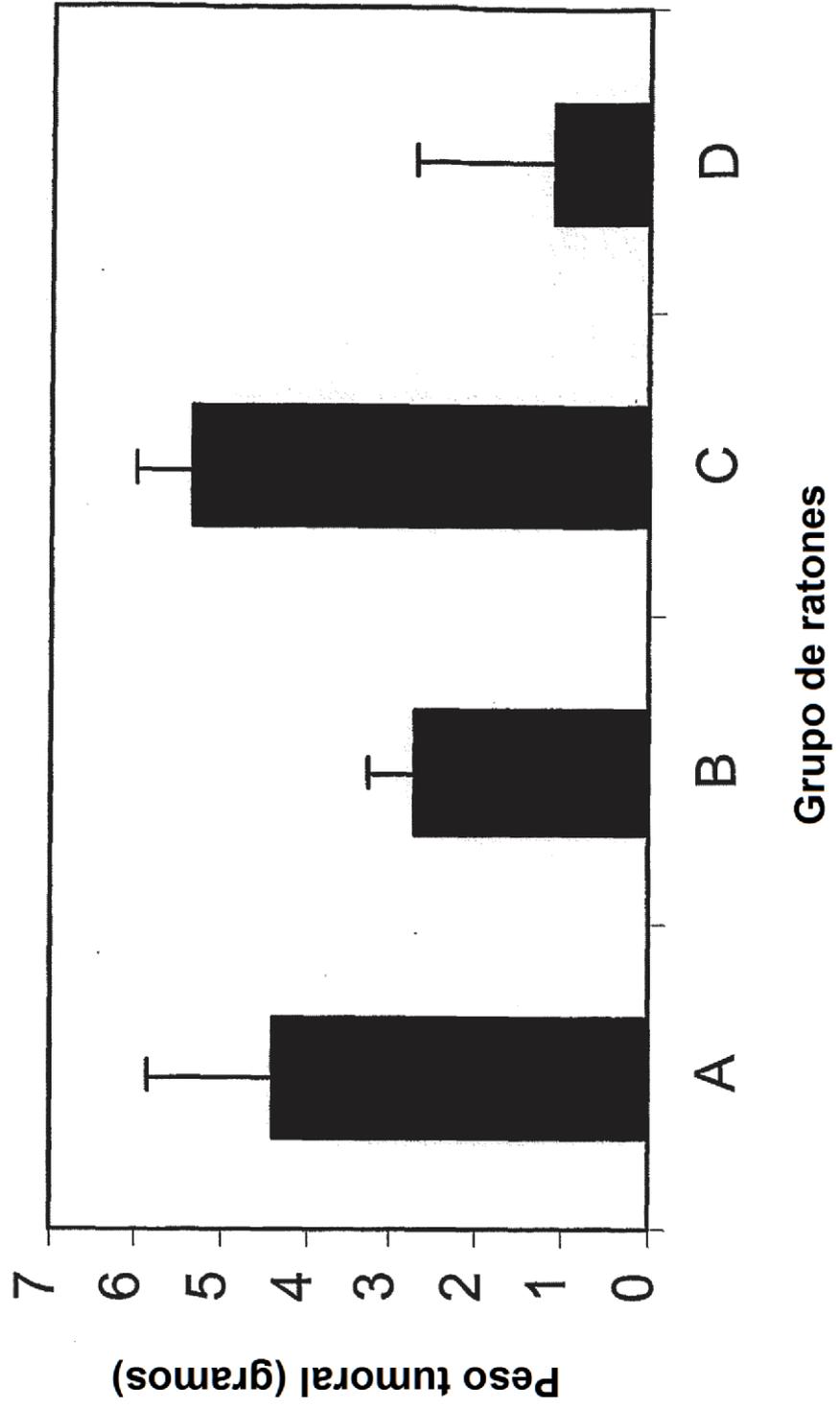
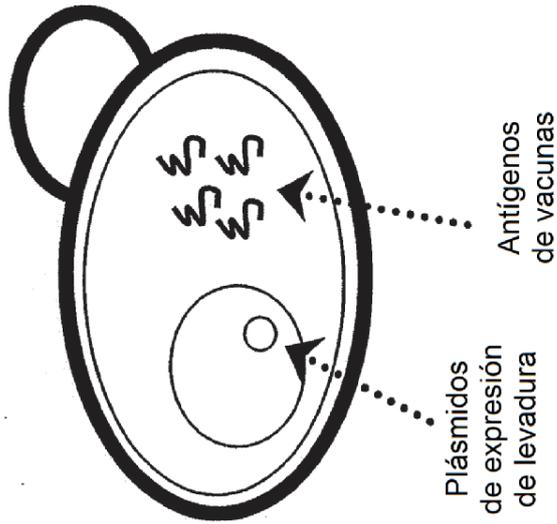
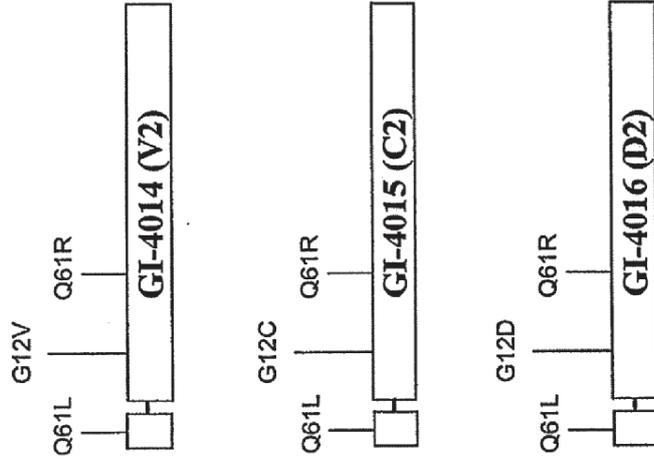


Fig. 7



Vacunas de fusión RAS multiantígeno

