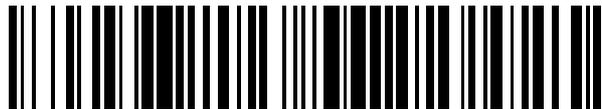


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 825**

51 Int. Cl.:

C07K 14/02	(2006.01)
A61K 39/29	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)
C12N 7/00	(2006.01)
A61P 35/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2011 PCT/EP2011/001168**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11113546**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2011 E 11707355 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2547695**

54 Título: **Vacunación tumoral que involucra una respuesta inmunitaria contra la proteína propia CLDN18.2**

30 Prioridad:

30.12.2010 EP 10016216
16.03.2010 EP 10002775

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2018

73 Titular/es:

BIONTECH PROTEIN THERAPEUTICS GMBH (50.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE y
TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ
GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

KLAMP, THORSTEN;
SAHIN, UGUR;
TÜRECI, ÖZLEM;
KOSLOWSKI, MICHAEL;
HILLER, THOMAS y
SCHUMACHER, JENS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 675 825 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

Vacunación tumoral que involucra una respuesta inmunitaria contra la proteína propia CLDN18.2

5 Campo técnico de la invención

La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia tumoral. En particular, la presente invención proporciona medios para la vacunación eficaz de un sujeto contra los antígenos asociados a tumor que son proteínas propias en dicho sujeto. La presente invención comprende una proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B o una porción de esta, y una secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo de un antígeno asociado a tumor. Además, la presente invención proporciona partículas similares a virus que comprenden dicha proteína y una composición inmunogénica que comprende dicha proteína o dichas partículas, en particular, para usar en aplicaciones profilácticas y/o terapéuticas, por ejemplo, para vacunación y/o terapia en el cáncer. La presente invención proporciona, además, métodos para la ruptura de la tolerancia a lo propio contra los antígenos asociados a tumor citados anteriormente y para tratar y/o prevenir una enfermedad tumorigénica en un sujeto.

Antecedentes de la invención

Las vacunas recombinantes son de particular importancia en la medicina humana y veterinaria para la profilaxis y la terapia de enfermedades infecciosas y cancerosas. El objetivo de una inmunización con una vacuna recombinante es inducir una reacción inmunitaria específica contra un antígeno definido, que es eficaz en la prevención o en la terapia de enfermedades definidas. Las vacunas recombinantes conocidas se basan en proteínas recombinantes, fragmentos de péptidos sintéticos, virus recombinantes, o ácido nucleico.

La mayoría de las vacunas recombinantes pueden dividirse en dos categorías: a) vacunas que inducen una respuesta inmunitaria humoral mediada por células B que resulta en la producción de anticuerpos específicos, y b) vacunas que inducen una respuesta inmunitaria celular mediada por células T, en particular linfocitos T citotóxicos.

La inducción de anticuerpos mediante la vacunación preventiva contra enfermedades infecciosas (por ejemplo, las vacunaciones contra las enfermedades de los niños) es una de las intervenciones médicas más eficaces y se ha aplicado exitosamente durante muchos años. Recientemente, se ha demostrado, además, que la administración pasiva terapéutica de anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra proteínas propias representa un método de terapia eficaz de enfermedades agudas y crónicas tales como el cáncer o la artritis reumatoide. Los ejemplos de estructuras diana de los AcM son la proteína soluble factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) para la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la psoriasis (preparación de AcM: Infliximab y Adalimumab), así como también las proteínas de superficie celular CD20 para el linfoma no Hodgkin (preparación de AcM: por ejemplo, Rituximab) y el receptor HER2/neu (preparación de AcM: Trastuzumab [Herceptin]) para cáncer de mama.

Sin embargo, la generación de anticuerpos monoclonales inmunoterapéuticamente eficaces (mediante el uso de hibridomas o las técnicas de exposición en fagos y las subsiguientes quimerización y humanización, respectivamente), consume mucho tiempo y es muy costosa, lo cual hasta la fecha ha impedido una aplicación clínica extensa. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de proporcionar una posibilidad para la vacunación activa contra moléculas propias en vez de la administración pasiva de anticuerpos monoclonales. En contraste con la inmunización pasiva, durante la vacunación activa se induce el propio sistema inmunitario del paciente para producir anticuerpos. La respuesta inmunitaria individualizada inducida de este modo evita los problemas de la terapia con anticuerpos monoclonales, tales como la intolerancia o la falta de sensibilidad a la terapia.

Sin embargo, la inducción activa de una respuesta inmunitaria humoral contra las proteínas propias requiere la ruptura de la tolerancia inmunológica a lo propio. Las proteínas propias o los péptidos de estas son solo muy débilmente inmunogénicos debido a la tolerancia inmunológica contra las proteínas propias. Las estrategias de inmunización existentes basadas en proteínas recombinantes o fragmentos de péptidos sintéticos para la inducción de respuesta de anticuerpos contra proteínas propias se basan, por lo tanto, en la administración concomitante del antígeno en combinación con adyuvantes inmunoestimuladores. Sin embargo, muchos adyuvantes potentemente eficaces, exhiben la desventaja de efectos adversos indeseables tales como toxicidad, reacciones inflamatorias, o respuesta sistémica no deseada de células T, y por lo tanto, sus usos deben evitarse en las estrategias de vacunación activa.

Existen ciertos requerimientos para una vacunación activa inmunoterapéuticamente eficaz tales como la ruptura de la tolerancia a lo propio contra las proteínas propias, evitar el uso de adyuvantes, la especificidad de los anticuerpos contra las proteínas en su conformación natural, y la inducción de anticuerpos con funciones inmunitarias efectoras.

Otro factor esencial para una vacunación activa exitosa en el contexto de una inmunoterapia del cáncer mediada por anticuerpos es la selección de una apropiada estructura diana del tumor.

Los requerimientos básicos para la estructura diana son la especificidad tumoral y la localización en la superficie celular. Esto permite la unión selectiva de los anticuerpos inducidos a las células tumorales y proporciona la posibilidad de ejercer directamente las funciones efectoras del anticuerpo contra estas células. Los antígenos asociados a tumor particularmente

interesante son los denominados antígenos de diferenciación específicos del tipo celular. Su expresión se limita a células de una especificidad y etapa de desarrollo particular en los tejidos normales. Sin embargo, en muchas enfermedades cancerosas, estos antígenos se expresan en el tejido tumorigénico.

5 Existe una necesidad urgente de desarrollar medios que permitan la inmunización activa que rompa la tolerancia a lo propio, sin la necesidad de administrar adyuvantes. En particular, existe la necesidad del desarrollo de medios que permitan la generación de anticuerpos con funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la inducción de la apoptosis y la inhibición de la proliferación, *in vivo*, en donde dichos anticuerpos se dirigen contra una proteína propia, tal como un antígeno asociado a tumor. Sahin y otros (2008) (Clin Cancer Res 14: 7624-7634) describe que la variante de corte y empalme 2 de Claudin-18 es una diana pancáncer adecuada para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos.

15 La presente invención se refiere al desarrollo de vacunas para la vacunación activa que son capaces de inducir anticuerpos en un organismo, en particular autoanticuerpos, que se unen a los antígenos de superficie de membrana propios de la célula en su conformación natural y posteriormente ejercen funciones efectoras terapéuticamente eficaces sobre las células que portan dichos antígenos de superficie de membrana celular.

20 El desarrollo de vacunas inmunoterapéuticas para el cáncer se describe de forma representativa para las estructuras diana claudina 18.2 (CLDN18.2), claudina 6 (CLDN6), y PLAC1, respectivamente. Las vacunas generadas son capaces de inducir una respuesta inmunitaria humoral efectiva que rompe la actual tolerancia inmunológica a lo propio, sin la administración concomitante de adyuvantes. Los anticuerpos inducidos son capaces, además, de reconocer las proteínas en su conformación natural y ejercer funciones efectoras terapéuticamente relevantes tales como la ADCC y/o la CDC.

Resumen de la invención

25 En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína que comprende una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, e insertada en ella una secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo, en donde el epítipo se deriva de una porción extracelular del antígeno asociado a tumor CLDN18.2. Dicha proteína se define por la reivindicación 1 de la presente invención. El antígeno asociado a tumor se expresa en un número limitado de tejidos y/u órganos específicos en condiciones normales y se expresa de manera aberrante en tejidos tumorales. Como se describe en la presente descripción, la proteína reivindicada es capaz de producir una respuesta inmunitaria humoral dirigida contra el antígeno asociado a tumor relacionado con la superficie de una célula cuando se administra a un sujeto en forma de una partícula similar a virus, sin adyuvante, en donde el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en dicho sujeto. La respuesta inmunitaria humoral comprende la generación de anticuerpos que exhiben una o más funciones efectoras inmunitarias contra las células que portan el antígeno asociado a tumor en su conformación natural. Las funciones efectoras inmunitarias comprenden, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), la inducción de apoptosis, la inhibición de la transducción de señales mediada por CD40L, y la inhibición de la proliferación. La función efectora inmunitaria puede comprender la activación de células efectoras, tal como ADCC.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica la proteína de la presente invención y un vector que comprende el ácido nucleico de la presente invención.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende el ácido nucleico o el vector de la presente invención.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una partícula similar a virus que comprende múltiples copias de la proteína de la presente invención. Se prefiere particularmente que la partícula similar a virus sea capaz de producir una respuesta inmunitaria humoral dirigida contra el antígeno asociado a tumor relacionado con la superficie de una célula cuando se administra sin adyuvante a un sujeto, en donde el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en dicho sujeto.

55 La presente invención proporciona, además, una composición inmunogénica que comprende la proteína, el ácido nucleico, el vector, la célula huésped o la partícula similar a virus de la presente invención y un diluyente, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición inmunogénica de la presente invención es para producir una respuesta inmunitaria humoral contra el antígeno asociado a tumor relacionado con la superficie de una célula en un sujeto, en donde el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en dicho sujeto. Se prefiere particularmente que la composición inmunogénica esté libre de adyuvantes.

60 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona la proteína, el ácido nucleico, el vector, la célula huésped, la partícula similar a virus, o la composición inmunogénica de la presente invención para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de tumores.

65 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir en un sujeto una respuesta inmunitaria humoral contra un antígeno asociado a tumor, en donde el antígeno asociado a tumor es una proteína propia

en dicho sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto la proteína, el ácido nucleico, el vector, la célula huésped, la partícula similar a virus, o la composición inmunogénica de la presente invención, en donde dicho sujeto está afectado por un tumor o está en riesgo de desarrollar un tumor, dicho tumor se caracteriza por la relación del antígeno asociado a tumor con la superficie de una célula tumoral.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la ruptura de la tolerancia a lo propio hacia un antígeno asociado a tumor en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto la proteína, el ácido nucleico, el vector, la célula huésped, la partícula similar a virus, o la composición inmunogénica de la presente invención, preferentemente, sin adyuvantes.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar y/o prevenir un tumor en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto la proteína, el ácido nucleico, el vector, la célula huésped, la partícula similar a virus, o la composición inmunogénica de la presente invención, preferentemente, sin adyuvantes.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación esquemática de los casetes de expresión de HBcAg (cadenas principales de HBcAg).

Las proteínas de fusión consisten en una región localizada en los extremos amino terminal y carboxilo terminal de la proteína HBcAg, en donde en todas las cadenas principales del HBcAg las partes de la región inmunodominante principal (MIR) del HBcAg pueden reemplazarse por epítomos de antígenos específicos (epítomo). Para aumentar la flexibilidad durante el ensamblaje en las VLP y aumentar la variación de las conformaciones de los epítomos, el epítomo insertado en la MIR puede flanquearse por enlazadores de glicina (G₄SG₄; sec. con núm. de ident.: 24). Todos los constructos, con la excepción del HBcAg Del 79-80 enlazador y HBcAg Del 79-80 portan sitios de restricción Sall y SpeI para la inserción adicional de epítomos en el extremo amino terminal de HBcAg. En el extremo carboxilo terminal de los constructos, se incorpora una etiqueta His (caja negra) que consiste en seis histidinas para la purificación en condiciones de desnaturalización. La etiqueta His se separa del extremo carboxilo terminal del HBcAg mediante un enlazador corto (secuencia de aminoácidos GGS). Se indican los sitios de restricción disponibles para propósitos de clonación y modificación.

Figura 2: Validación de la competencia del ensamblaje para proteínas de fusión de HBcAg seleccionadas.

Las VLP de HBcAg ensambladas y purificadas in vitro se analizaron mediante el uso de la electroforesis en gel de agarosa natural o microscopía electrónica de transmisión de contraste negativo (TEM). El análisis se muestra ilustrativamente para las VLP de HBcAg, HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto (CLDN18.2-enlazador), HBcAg Del 79-80 CLDN18.2-EC1 corto (CLDN18.2), y la variante truncada de HBcAg de tipo silvestre como control (HBcAgΔ; sec. con núm. de ident.: 79). La barra negra indicada dentro de las imágenes TEM corresponde a una longitud de 200 nm.

Figura 3: Análisis de la inmunofluorescencia indirecta para la determinación de la inmunorreactividad del antisuero después de la inmunización de ratones Balb/c o conejos NZW.

A) Las células de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC Núm. CCL-61) se cotransfectaron con eGFP-N3 (variante GFPmut1) en combinación con CLDN18.2 y CLDN18.1 de conejo o ratón, respectivamente, se incubaron durante 24 horas, posteriormente se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4 % y posteriormente se permeabilizaron con saponina 0.2 %. La incubación con suero policlonal de conejo 5 diluido (1:100) se realizó durante una hora (Inmunógeno usado para la generación del suero de conejo #5: VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto + adyuvantes de Freund). Se usó un anticuerpo monoclonal IgG(H+L) de cabra anti-conejo conjugado con CY3 como anticuerpo secundario, a una dilución de 1:200 y se añadió durante 30 minutos. Para teñir los núcleos de las células se usó DAPI a una dilución de 1:10000. **B)** El análisis de IF se realizó como se describe en A). Para la detección de CLDN18.2 se usó el antisuero policlonal en ratón diluido 1/4 (1:100) (Inmunógeno usado para la generación del antisuero 1/4: VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto sin adyuvantes). Se usó un anticuerpo monoclonal IgG(H+L) de cabra anti-ratón conjugado a CY3 como anticuerpo secundario, a una dilución de 1:200. **C)** Las células CHO se cotransfectaron con eGFP-TES85 (localizado dentro del núcleo celular) y PLAC1 humano y se fijaron con PFA 4 % después de 24 horas de cultivo. El antisuero de conejo PLAC1 #9 diluido (1:500) se usó como el antisuero policlonal para la detección de PLAC1 (Inmunógeno usado para la generación del antisuero PLAC1 #9: VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador PLAC1 3^{er} Lazo A + adyuvantes de Freund) y PLAC1 #10 (Inmunógeno usado para la generación del antisuero PLAC1 #10: VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador PLAC1 3^{er} Lazo A sin adyuvantes), respectivamente. Se usó un anticuerpo monoclonal IgG(H+L) de cabra anti-conejo conjugado a CY3 como anticuerpo secundario a una dilución de 1:200.

Figura 4: Análisis por FACS de la inmunorreactividad de antisueros de conejo después de la inmunización con el epítomo de CLDN18.2 humano que portan las VLP de HBcAg quimérica.

Para el análisis por FACS se usaron 1x10⁵ células NUG-C4 que expresan CLDN18.2 humana (hsCLDN18.2) de manera endógena. Las células se incubaron durante una hora con suero de conejo diluido (1:50). Después de una etapa de lavado, se realizó la incubación durante media hora con el anticuerpo monoclonal secundario de cabra anti-IgG(H+L) de conejo marcado con Alexa647 diluido (1:100). Se muestran las superposiciones de los histogramas de las señales fluorescentes para suero de conejo previo a la inmunización (blanco) y suero final (gris y negro, respectivamente). Todos

los conejos se inmunizaron con VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto. El conejo 3 se inmunizó sin adición de adyuvantes, mientras que a los conejos 4 y 5 se les administró el adyuvante de Freund y al conejo 6 se le administró el adyuvante Montanide ISA 720 que se aprobó para aplicaciones clínicas.

5 Figura 5: Análisis de las funciones efectoras citotóxicas del antisuero policlonal dirigido a CLDN18.2 después de la inmunización activa.

A) Ensayo de CDC basado en luciferasa. *Las células CHO que expresan establemente CLDN18.2 humana (hsCLDN18.2) o la isoforma claudina 18.1 (hsCLDN18.1) se transfectaron con el ARN que codifica la luciferasa transcrito in vitro (IVT),* 24 horas antes del ensayo. Posteriormente, las células se incubaron durante 30 minutos con el antisuero policlonal indicado antes de adicionar suero humano activo o inactivado por calor durante 30 minutos. Después de 5 horas de incubación, se adicionó un tampón que contenía luciferina y se calculó el porcentaje de células muertas (después de restar la luminiscencia de fondo y en comparación con las células que se incubaron con PBMC pero sin adición de antisuero). B) Ensayo de ADCC basado en luciferasa. Un día antes del ensayo, las células NUG-C4 que expresan hsCLDN18.2 de manera endógena se transfectaron con el ARN IVT de luciferasa. Posteriormente, las células se incubaron con el antisuero policlonal indicado durante 30 minutos antes de adicionar células mononucleares humanas aisladas de sangre periférica (PBMC) como células efectoras. Después de 5 horas de incubación, se adicionó un tampón que contenía luciferina y se calculó el porcentaje de células muertas (después de restar la luminiscencia de fondo y en comparación con las células que se incubaron con PBMC pero sin adición de antisuero). Los conejos 3 a 6, así como también los ratones 1/4, 6/3 y 6/4 se inmunizaron con VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto (CLDN18.2-enlazador). El conejo 3 y el ratón 1/4 recibieron el inmunógeno sin adición de adyuvantes, mientras que los conejos 4 y 5 recibieron el adyuvante de Freund, el conejo 6 Montanide ISA 720, y los ratones 6/3 y 6/4 Abisco100. El antisuero del conejo 2 que se inmunizó con VLP de HBcAg de tipo silvestre truncada en el C-terminal (HBcAg Δ), y el del ratón 11/2 al que se le administró un péptido de CLDN18.2 conjugado a KLH cuya secuencia era idéntica al epítipo insertado en HBcAg, se usaron como controles.

Figura 6: Análisis de las funciones efectoras antiproliferativas del antisuero policlonal dirigido a PLAC1 después de la inmunización activa.

A) Inhibición de la proliferación de células MCF-7 de epitelio de cáncer de mama humano que expresan PLAC1 (ATCC núm. HTB-22). Se sembraron 5000 células por pocillo en medio que contiene FCS 10 % y se incubaron durante 72 horas con el antisuero policlonal dirigido a PLAC1 diluido (1:100 o 1:1000). Posteriormente, se realizó un ensayo de proliferación basado en BrdU que usa el kit de proliferación celular Delfia. La tasa de proliferación (en %) se calculó con respecto a un control de medio (= 100 %). Un anticuerpo policlonal anti-CLDN18.2 que se generó mediante inmunización activa (anti-CLDN18.2) así como también un anticuerpo monoclonal anti-myc se usaron como sueros controles. B) No inhibición de la proliferación en células MelHO PLAC1-negativas. El procedimiento se realizó como se describe en A). Para la inmunización activa anti-PLAC1 se usaron como inmunógenos el HBcAg Del 79-80 enlazador PLAC1 3^{er} Lazo A (suero #9 con adyuvantes, suero #10 sin adyuvantes) así como también el HBcAg Del 79-80 PLAC1 3^{er} Lazo B suero #11 con adyuvantes).

Figura 7: Secuencias de las cadenas principales de HBcAg.

El ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos de las diversas cadenas principales de HBcAg se muestran en código de una letra. La numeración de la secuencia se indica a la izquierda y a la derecha de la secuencia, respectivamente.

- 45  indica los dominios amino y carboxilo terminal de HBcAg, respectivamente;
-  indica enlazadores de glicina insertados (cursiva, negrita) e
-  indica la etiqueta His localizada en el extremo carboxilo terminal (negrita).

Figura 8: Secuencias de los constructos de expresión de HBcAg quimérico que se usaron para la generación de VLP que portan el epítipo.

El ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de los diversos constructos de expresión de HBcAg quiméricos se muestran en código de una letra. La numeración de la secuencia se indica a la izquierda y a la derecha de la secuencia, respectivamente.

- 55  indica los dominios amino y carboxilo terminal de HBcAg, respectivamente;
-  indica enlazadores de glicina insertados (cursiva, negrita) e
-  indica la etiqueta His localizada en el extremo carboxilo terminal (negrita). Las secuencias de aminoácidos de los epítopos insertados CLDN18.2 y PLAC1, respectivamente, se representan en negrita y están subrayadas.

Figura 9: La vacunación profiláctica con el epítipo CLDN18.2 que portan las VLP de HBcAg quimérica (VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto) confiere protección parcial en un modelo tumoral en ratón singénico inmunocompetente

5 El análisis macroscópico de los pulmones derivados de los ratones vacunados con las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto (CLDN-enlazador) reveló un menor número de nódulos metastásicos en comparación con los grupos inmunizados con las VLP de HBcAg que comprende una proteína truncada en el extremo C-terminal (aminoácidos 1-150) (HBcAgΔ) o grupos controles inmunizados con PBS (A) y los pesos pulmonares fueron significativamente más bajos, similares a los de los ratones no desafiados con células tumorales (B). El porcentaje de área de tejido canceroso por sección pulmonar completa calculada después de visualizar metástasis pulmonares CT26-CLDN18.2 mediante tinción por IHC para CLDN18.2 fue significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con grupos controles de ratones vacunados con las VLP de HBcAgΔ o PBS (C, D).

15 Descripción detallada de la invención

Aunque la presente invención se describe en detalle más abajo, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente descripción, ya que pueden variar. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto en la técnica.

20 A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con modalidades específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. Los ejemplos descritos de diversas maneras y las modalidades preferidas no deben interpretarse para limitar la presente invención a solamente las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción sustenta y abarca modalidades que combinan las modalidades descritas explícitamente con cualquier cantidad de elementos revelados y/o preferidos. Además, cualquiera de las permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta aplicación deben considerarse reveladas por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera. Por ejemplo, si en una modalidad preferida la proteína de la presente invención comprende una secuencia enlazadora que flanquea la secuencia del epítipo y en otra modalidad preferida, la proteína de la presente invención comprende una etiqueta de péptido, es una modalidad preferida contemplada de la proteína de la presente invención, que la proteína comprende una secuencia enlazadora que flanquea la secuencia del epítipo y una etiqueta de péptido.

35 Preferentemente, los términos usados en la presente descripción se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suiza, (1995).

40 La práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (ver, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da Edición, J. Sambrook y otros eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

45 A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderán que implican la inclusión de un miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas indicadas pero no la exclusión de cualquier otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares usados en el contexto para describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción, o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de los intervalos de valores en la presente descripción pretende servir simplemente como un método abreviado de referencia individual para cada valor separado que cae dentro del intervalo. Todos los métodos descritos en la presente descripción pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de cualquier otra forma en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o de lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en la presente descripción, sólo tiene la intención de aclarar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se declare de cualquier otra manera. De ninguna manera el lenguaje en la descripción debe interpretarse como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

60 Definiciones

A continuación, se proporcionarán definiciones que se aplican a todos los aspectos de la presente invención.

65 El virus de la hepatitis B (HBV) es un miembro de la familia Hepadnavirus. La partícula del virus consiste en una envoltura lipídica externa y un núcleo nucleocápside icosaédrico compuesto por la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B. El genoma del HBV consiste de ADN circular. Hay cuatro genes conocidos codificados por el genoma llamados C, X, P y S. La proteína del núcleo está codificada por el gen C y su codón de inicio está precedido por un codón de inicio

AUG en el extremo 5' en el mismo marco de lectura, a partir del cual se produce el precursor de la proteína del núcleo. La proteína codificada por el gen C está presente en al menos cuatro polipéptidos diferentes de HBV funcionalmente relevantes: p25 (proteína preC), p22 (forma de p25 escindida en N-terminal), p21 (monómero de HBcAg como tal), y p17 (HBsAg, forma de p25 escindida en el extremo N y C terminal). De estos polipéptidos, solo el monómero HBcAg es capaz de autoensamblarse en una partícula similar a virus. Tales partículas similares a virus pueden contener 180 o 240 copias de la proteína HBcAg y pueden tener un diámetro de aproximadamente 30 nm o 34 nm. La proteína HBcAg comprende una región N-terminal que es capaz de autoensamblarse en partículas similares a virus. El C-terminal límite para truncamientos C-terminales que aún son capaces de autoensamblarse en partículas de HBcAg se mapeó entre los residuos de aminoácidos 139 y 144. El dominio C-terminal rico en argininas similar a protamina que corresponde a los aminoácidos 150 a 183 es prescindible para el autoensamblaje. Su función es la unión de ácidos nucleicos. La denominada región principal inmunodominante (MIR) se localiza dentro de un lazo superficial alrededor de los residuos de aminoácidos 74 a 89 de la proteína HBcAg.

El término "proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B" o "proteína HBcAg" en el contexto de la presente invención se refiere al polipéptido p21 de cualquier virus perteneciente a la familia Hepadnaviridae, preferentemente al polipéptido p21 del virus de la hepatitis B de cualquier serotipo de virus hepatitis B, tales como los serotipos adr, adw, ayr, y ayw, o los genotipos, tales como los genotipos A, B, C, D, E, F, G, y H. Preferentemente, el polipéptido p21 del virus de la hepatitis B se deriva del serotipo del virus de la hepatitis B ayw. Preferentemente, la proteína HBcAg comprende, preferentemente consiste esencialmente en, preferentemente consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 1, una variante o porción de esta. La secuencia de ácido nucleico expuesta en la sec. con núm. de ident.: 2 codifica para la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 1. En el contexto de la presente invención, el término "proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B" o "proteína HBcAg" incluye cualquier variante y/o porciones de esta, en donde preferentemente, dichas variantes y/o porciones de esta son capaces de ensamblarse en partículas similares a virus, preferentemente en una partícula similar al virus icosaédrica, que consiste preferentemente, en 180 o 240 copias de subunidades HBcAg. Aunque el gen C es el más conservado entre los genes del HBV, se han identificado numerosas sustituciones de aminoácidos para la proteína HBcAg. Por lo tanto, el término "variante de proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B" incluye, en particular, cualquiera de las variantes de la proteína HBcAg que se producen de manera natural. Dicho término incluye, además, cualquiera de las variantes generadas sintéticamente que no se producen de forma natural y que son capaces de ensamblarse en partículas similares a virus.

El término "partícula similar a virus" o "VLP" se refiere a una cápside de virus vacía, que se forma por autoensamblaje de las proteínas de envoltura y/o cápside de muchos virus, que incluye VIH-1, virus de rubéola, virus del papiloma humano, virus Semliki Forest, fagos de ARN y Hepadnaviridae, tales como el virus de la hepatitis B. Las partículas similares a virus se asemejan al virus del que se derivaron, pero carecen de cualquier ácido nucleico viral y, por lo tanto, no son infecciosas. Las partículas similares a virus de la presente invención comprenden proteínas antigénicas del núcleo del virus de hepatitis B quiméricas. Las partículas similares a virus de la invención no son infecciosas porque se ensamblan sin incorporar material genético. El término "proteína antigénica del núcleo del virus de hepatitis B quimérica" se refiere a una proteína que comprende una proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B o una porción de esta y una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína distinta de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, tal como una secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo que se deriva de un antígeno asociado a tumor. En una modalidad preferida de la presente invención, la partícula similar a virus comprende una proteína de HBcAg derivada de un virus de hepatitis B como un vehículo para la integración de epítipos heterólogos. Sin embargo, pueden usarse, además, los genes HBcAg de cualquier otro Orthohepadnavirus o Avihepadnavirus.

El término "porción" se refiere a una fracción. Con respecto a una estructura particular tal como una secuencia de aminoácidos o proteína, el término "porción" de esta puede designar una fracción continua o discontinua de dicha estructura. Preferentemente, una porción de una secuencia de aminoácidos comprende al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, preferentemente al menos 40 %, preferentemente al menos 50 %, más preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 70 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, y con la máxima preferencia al menos 90 % de los aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Preferentemente, si la porción es una fracción discontinua, dicha fracción discontinua está compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más partes de una estructura, siendo cada parte un elemento continuo de la estructura. Por ejemplo, una fracción discontinua de una secuencia de aminoácidos puede conformarse de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más, preferentemente, no más de 4 partes de dicha secuencia de aminoácidos, en donde cada parte comprende, preferentemente, al menos 5 aminoácidos continuos, al menos 10 aminoácidos continuos, preferentemente, al menos 20 aminoácidos continuos, preferentemente al menos 30 aminoácidos continuos de la secuencia de aminoácidos. El término "parte" se refiere a un elemento continuo. Por ejemplo, una parte de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos o proteína se refiere a un elemento continuo de dicha estructura. Una porción, o una parte de una estructura, preferentemente, comprenden una o más propiedades funcionales de dicha estructura. Por ejemplo, una porción o una parte de un epítipo o péptido es, preferentemente, inmunológicamente equivalente al epítipo del que se deriva.

El término "porción de esta" en el contexto de la proteína HBcAg se refiere a una porción de la proteína HBcAg que comprende al menos 30, preferentemente 50, más preferentemente 80, más preferentemente 90, más preferentemente 100, incluso más preferentemente 110, incluso más preferentemente 120, incluso más preferentemente 130 o más aminoácidos de la proteína HBcAg. El término "porción" incluye, además, una porción discontinua de la secuencia de

aminoácidos de la proteína HBcAg. Por ejemplo, una porción de HBcAg de 138 aminoácidos puede consistir en los aminoácidos 1 a 75 y 82 a 144 de la proteína HBcAg como se expone en la sec. con núm. de ident.: 1 o aminoácidos que corresponden a dichos aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1. Se prefiere que la discontinuidad se encuentre dentro de la región correspondiente a la MIR, por ejemplo, la región alrededor de los aminoácidos 74 a 89 de la proteína HBcAg. Se prefiere que la porción de HBcAg sea capaz de ensamblarse en partículas similares a virus. En el caso de una porción discontinua de la proteína HBcAg, se prefiere que dicha porción discontinua sea capaz de ensamblarse en partículas similares a virus, si las partes de la porción discontinua se unen juntas en su orden natural. Esta unión puede ser directa o mediante un enlazador, por ejemplo, mediante una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de epítipo.

La frase "la proteína es capaz de ensamblarse en partículas similares a virus" o formulaciones similares significa que una pluralidad de la proteína (y no solo una copia única de la proteína) es capaz de ensamblarse en partículas similares a virus. En este contexto, la partícula similar a virus ensamblada no necesariamente tiene que asumir la estructura de partícula similar a virus HBcAg natural, es decir, que tiene 180 o 240 subunidades en una forma icosaédrica, pero cualquier estructura que sea similar a cualquier estructura de partículas similar a virus, por ejemplo, una partícula similar a virus compuesta de 30, 50, 70, 90 o 150 subunidades que pueden, por ejemplo, exhibir una forma irregular, siempre que la partícula similar a virus sea estable en una extensión razonable. Por ejemplo, la partícula similar a virus debería ser lo suficientemente estable como para formularse en una composición farmacéutica y administrarse a un paciente. El experto en la técnica puede determinar fácilmente si una proteína es capaz de ensamblarse en partículas similares a virus. Por ejemplo, la proteína puede expresarse en un sistema de expresión heterólogo. El ensamblaje de las partículas similares a virus se produce dentro del citoplasma del huésped de expresión. Las células se recolectan, por ejemplo, mediante filtración de flujo tangencial, y se lisan, por ejemplo, mediante el uso de un microfluidizador. Los restos celulares se eliminan y el lisado soluble se analiza para determinar la presencia de partículas similares a virus. Por ejemplo, las partículas similares a virus pueden concentrarse y purificarse previamente mediante ultrafiltración, interacción hidrófoba, hidroxapatita o cromatografía azul de sefrosa. Las partículas similares a virus pueden purificarse adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de exclusión de tamaño y/o ultrafiltración. Después las partículas similares a virus concentradas y purificadas pueden detectarse por tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión, electroforesis en gel de agarosa natural, fraccionamiento asimétrico de flujo de campo (AF4) combinado con dispersión dinámica de luz (DLS) y/o ELISA de captura mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico de conformación.

Una secuencia de aminoácidos (primera secuencia de aminoácidos) "insertada en" otra secuencia de aminoácidos (segunda secuencia de aminoácidos) o una secuencia de aminoácidos "insertada allí dentro" significa que la primera secuencia de aminoácidos se integra en la segunda secuencia de aminoácidos entre dos aminoácidos de la estructura primaria de la segunda secuencia de aminoácidos. Preferentemente, la primera y la segunda secuencia de aminoácidos se conectan por enlaces peptídicos. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos insertada en el contexto de la presente invención es la inserción de una secuencia de epítipo, por ejemplo, derivada de un antígeno asociado a tumor, entre dos aminoácidos dentro de la MIR de la proteína HBcAg y/o entre dos aminoácidos dentro del extremo N-terminal de la proteína HBcAg como se muestra en la Figura 1, por ejemplo, entre los sitios de restricción Sall y Spel. En el contexto de la presente invención, una primera secuencia de aminoácidos insertada en una segunda secuencia de aminoácidos puede significar, además, que la primera secuencia de aminoácidos reemplaza uno o más, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, aminoácidos de la segunda secuencia de aminoácidos.

Una secuencia de aminoácidos (primera secuencia de aminoácidos) se destina para estar "unida a" otra secuencia de aminoácidos (segunda secuencia de aminoácidos) si la primera secuencia de aminoácidos se une a cualquier aminoácido de la segunda secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por entrecruzamiento químico o un enlace peptídico. Si una secuencia de aminoácidos se conecta al aminoácido amino terminal o carboxilo terminal de la segunda secuencia de aminoácidos, está unida a la segunda secuencia de aminoácidos. Una variedad de enlazadores cruzados están disponibles comercialmente en proveedores importantes tales como Pierce, Molecular Probes y Sigma. Pueden usarse reactivos homobifuncionales, que reaccionan específicamente con los grupos amino primarios (es decir, grupos ε-amino de residuos de lisina). Son solubles en disolventes acuosos y pueden formar enlaces covalentes. Además pueden usarse, los imidoésteres homobifuncionales con diferentes longitudes de brazos espaciadores entre sus grupos terminales reactivos, tales como dimetil adipimidato (DMA), dimetil suberimidato (DMS) y dimetil pimelimidato (DPM) con brazo espaciador de, por ejemplo, 8.6 Å, 11 Å, o 9.2 Å. Además, pueden usarse enlazadores cruzados homobifuncionales reversibles tales como ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), tales como ditiobis (succinimidilpropionato) (DSP) o ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato) DTSSP. Alternativamente, puede usarse un enlazador cruzado heterobifuncional, por ejemplo, un enlazador cruzado con un extremo amino reactivo y una porción sulfidrido reactivo en el otro extremo. Por ejemplo, pueden usarse enlazadores cruzados heterobifuncionales con un éster de NHS en un extremo y un grupo reactivo de SH, tales como meleimidias o disulfuros de piridilo. Pueden usarse, además, reactivos heterobifuncionales que contienen un grupo fotorreactivo, tal como Bis[2-(4-azidosalicilamido)etil] disulfuro BASED.

Una secuencia de aminoácidos (primera secuencia de aminoácidos) se destina para "reemplazar" (un) aminoácido(s) u otra secuencia de aminoácidos (segunda secuencia de aminoácidos) si el aminoácido(s) o la segunda secuencia de aminoácidos se (son) elimina(das) completamente y en su lugar la primera secuencia de aminoácidos se ubica en la posición donde el aminoácido(s) o la segunda secuencia de aminoácidos estaba (estaban) localizada(s).

Se dice que los residuos en dos o más polipéptidos se "corresponden" entre sí si los residuos ocupan una posición análoga en las estructuras de los polipéptidos. Como se conoce en la técnica, pueden determinarse las posiciones análogas en dos o más polipéptidos mediante el alineamiento de las secuencias de los polipéptidos en base a la secuencia de aminoácidos o a las similitudes estructurales. Tales herramientas de alineamiento son bien conocidas por el experto en la técnica y pueden obtenerse, por ejemplo, en la Internet, por ejemplo, ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw) o Align (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) mediante el uso de las configuraciones estándar, preferentemente para Align EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5. Los expertos en la técnica comprenden que puede ser necesario introducir brechas en cualquier secuencia para producir una alineación satisfactoria. Se dice que los residuos en dos o más secuencias de polipéptidos "corresponden" si los residuos están alineados en el mejor alineamiento de secuencia. El "mejor alineamiento de secuencia" entre dos polipéptidos se define como el alineamiento que produce el mayor número de residuos idénticos alineados. La "región de mejor alineamiento de secuencia" finaliza y, por lo tanto, determina la asignación y los límites de la longitud de la secuencia de comparación para propósitos de determinación del puntaje de similitud, si la similitud de secuencia, preferentemente la identidad, entre dos secuencias alineadas cae a menos de 30 %, preferentemente menos de 20 %, más preferentemente menos de 10 % en una longitud de 10, 20 o 30 aminoácidos.

Para los propósitos de la presente invención, las "variantes" de una proteína o péptido, o de una secuencia de aminoácidos, comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína se denominan, además, variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio determinado de una secuencia de aminoácidos, aunque es posible, además, una inserción aleatoria con un tamizaje adecuado del producto resultante.

Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones amino y/o carboxilo terminales de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, o más aminoácidos. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, una proteína de HBcAg que comprende una etiqueta de péptido fusionado al carboxilo terminal, tal como una etiqueta de His, se considera una variante de adición de HBcAg.

Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como por la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, o más aminoácidos. Las delecciones pueden estar en cualquier posición de la proteína. En el contexto de la proteína HBcAg usada en la presente invención, una variante de delección de aminoácidos preferida de HBcAg es una delección dentro de la región MIR, por ejemplo, dentro de los aminoácidos alrededor de las posiciones 74 a 89 de la sec. con núm. de ident.: 1 o aminoácidos correspondientes. Además, en el contexto de la presente invención, se prefiere que la proteína HBcAg esté truncada en el extremo C-terminal, es decir, que tenga una delección/truncamiento en el extremo C-terminal. Preferentemente, dicho truncamiento C-terminal se extiende desde el extremo C hasta, e incluye, cualquier aminoácido hasta el aminoácido en la posición 140 en la secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 1 o una secuencia de aminoácidos correspondiente. Un truncamiento C-terminal de una proteína en la posición del aminoácido 140 significa que los aminoácidos de la posición 140 hasta el extremo C-terminal de la proteína completa están ausentes en la proteína truncada en el C-terminal, es decir, que la proteína truncada en el C-terminal termina con el aminoácido 139 (que incluye el aminoácido 139).

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación, al menos, de un residuo en la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. La preferencia está dada en las modificaciones que están en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre las proteínas o péptidos homólogos y/o en el reemplazo de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteína son cambios de aminoácidos conservativos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de forma similar. Un cambio conservativo de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que son relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos que se encuentran en la naturaleza se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), aminoácidos básicos (lisina, arginina, histidina), aminoácidos no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y aminoácidos polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). En algunas ocasiones la fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferentemente, el grado de similitud, preferentemente, la identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada, por ejemplo, entre la secuencia de HBcAg preferida expuesta en la sec. con núm. de ident.: 1 y la variante HBcAg o entre las secuencias preferidas del antígeno asociado a tumor, por ejemplo, expuestas en las secs. con núms. de ident. y las variantes del antígeno asociado a tumor, serán al menos 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %. El grado de similitud o de identidad está dado, preferentemente, para una región de al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140 o 160 aminoácidos. En modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad está dado por la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. El alineamiento para determinar la similitud de secuencia,

- preferentemente, la identidad de secuencia, puede realizarse con herramientas conocidas en la técnica, preferentemente mediante el uso del mejor alineamiento de secuencia, por ejemplo, mediante el uso de Align, a través del uso de configuraciones estándar, preferentemente, EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5. Debe entenderse que en modalidades preferidas, la variante HBcAg es una variante de delección y/o una variante de truncamiento, por ejemplo, que porta una delección dentro de la MIR o un truncamiento en el extremo carboxilo terminal. Además, en modalidades particularmente preferidas, las variantes son variantes que se producen naturalmente. Los ejemplos preferidos de las variantes de la proteína HBcAg si se usa la sec. con núm. de ident.: 1 como secuencia de referencia, comprenden mutaciones en una o más de las posiciones.
- Las proteínas y las secuencias de ácido nucleico de la presente invención comprenden, además, variantes de las proteínas de la presente invención y de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención. La definición anterior para variantes de proteínas se aplica, además, correspondientemente a las variantes de secuencia de ácido nucleico.
- Las variantes de proteína y de secuencias de ácido nucleico descritas en la presente descripción pueden prepararse fácilmente por la persona experta, por ejemplo, mediante manipulación del ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para la preparación de proteínas y péptidos que tienen sustituciones, inserciones o delecciones, se describe en detalle en Sambrook y otros, (1989), por ejemplo. Además, las variantes de aminoácidos y péptidos descritas en la presente descripción pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas conocidas de síntesis de péptidos tales como, por ejemplo, mediante la síntesis en fase sólida y métodos similares.
- Las proteínas y péptidos descritos en la presente descripción pueden ser derivados de proteínas y péptidos. De acuerdo con la invención, los "derivados" de proteínas y péptidos son formas modificadas de proteínas y péptidos. Tales modificaciones incluyen cualquier modificación química y comprenden sustituciones, delecciones y/o adiciones, simples o múltiples, de cualquiera de las moléculas asociadas con la proteína o péptido, tales como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o péptidos. El término "derivado" se extiende, además, a todos los equivalentes químicos funcionales de dichas proteínas y péptidos. Preferentemente, un péptido modificado, es decir, un péptido derivado, exhibe estabilidad aumentada y/o inmunogenicidad aumentada.
- De acuerdo con la invención, una variante, derivado, porción, parte o fragmento de un péptido o proteína o de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos, preferentemente, tiene una propiedad funcional del péptido o proteína o del ácido nucleico o secuencia de aminoácidos, respectivamente, de la cual se derivó. Tales propiedades funcionales comprenden propiedades inmunológicas tales como la interacción con anticuerpos, la interacción con otros péptidos o proteínas, y el ensamblaje en partículas similares a virus.
- El término "inmunológicamente equivalente" significa que la secuencia de aminoácidos inmunológicamente equivalente exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo, con respecto al tipo del efecto inmunológico tal como la inducción de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, la fortaleza y/o la duración de la reacción inmunitaria inducida, o la especificidad de la reacción inmunitaria inducida. En el contexto de la proteína HBcAg quimérica de la invención, el término "inmunológicamente equivalente" se usa, preferentemente, con respecto a los efectos o propiedades inmunológicas del epítipo derivado de un antígeno asociado a tumor que está comprendido por la proteína HBcAg quimérica. Una propiedad inmunológica particular es la capacidad de unirse a anticuerpos y, cuando sea apropiado, generar una respuesta inmunitaria, preferentemente, por estimular la generación de anticuerpos. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos es inmunológicamente equivalente a una secuencia de aminoácidos de referencia si dicha secuencia de aminoácidos, cuando se expone al sistema inmunitario de un sujeto, induce una reacción inmunitaria, preferentemente de anticuerpos, que tienen una especificidad de reacción con la secuencia de aminoácidos de referencia, tal como la secuencia de aminoácidos de referencia que forma parte de un antígeno asociado a tumor.
- En el contexto de la presente invención, los términos "antígeno asociado a tumor" o "antígeno tumoral" se relacionan con proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas específicas del desarrollo, por ejemplo, el antígeno asociado a tumor puede expresarse en condiciones normales específicamente en tejido de estómago, preferentemente, en la mucosa gástrica, en órganos reproductores, por ejemplo, en testículos, en tejido trofoblástico, por ejemplo, en la placenta, o en células de la línea germinal, y se expresan o se expresan de manera aberrante en uno o más tejidos tumorales. En este contexto, "un número limitado" significa, preferentemente, no más de 3, más preferentemente no más de 2. La expresión de antígenos asociados a tumor se reactiva en tejidos tumorales independientemente del origen del tumor, es decir, el tejido u órgano del que se origina/deriva el tumor. Los antígenos asociados a tumores en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, antígenos de diferenciación, preferentemente, antígenos de diferenciación de tipo celular específico, es decir, proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en un cierto tipo de célula, en una cierta etapa de diferenciación, antígenos de cáncer/testículos, es decir, proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en testículos y algunas veces en la placenta, y antígenos específicos de línea germinal. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor se relaciona, preferentemente, con la superficie celular de una célula tumoral y, preferentemente, no se expresa o solo se expresa rara vez en tejidos normales. Preferentemente, el antígeno asociado a tumor o la expresión aberrante del antígeno asociado a tumor identifica células tumorales, preferentemente, células cancerosas. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor que se expresa por una célula tumoral en un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad tumorigénica, preferentemente, es una proteína propia

- en dicho sujeto. En modalidades preferidas, no pueden encontrarse autoanticuerpos dirigidos contra el antígeno asociado a tumor en un nivel detectable en condiciones normales en un sujeto que porta dicho antígeno asociado a tumor, o tales autoanticuerpos solo pueden encontrarse en una cantidad por debajo de una concentración umbral que sería necesaria para causar daño al tejido o a las células que portan dicho antígeno asociado a tumor. En modalidades preferidas, el antígeno asociado a tumor en el contexto de la presente invención se expresa en condiciones normales específicamente en un tejido u órgano que no es esencial, es decir, tejidos u órganos que cuando son dañados por el sistema inmunitario no conducen a la muerte del sujeto, o en órganos o estructuras del cuerpo que no son, o son difícilmente asequibles, al sistema inmunitario. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del antígeno asociado a tumor es idéntica entre el antígeno asociado a tumor que se expresa en tejidos normales y el antígeno asociado a tumor que se expresa en tejidos tumorigénicos. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor, preferentemente, no es un producto de un gen supresor tumoral mutado o un oncogén mutado o de cualquier otro gen mutado, a menos que esta mutación esté presente en la línea germinal del sujeto que expresa dicho antígeno asociado a tumor. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor, preferentemente, no es un antígeno tumoral producido por un virus oncogénico.
- Los ejemplos de antígenos de diferenciación que cumplen idealmente los criterios para antígenos asociados a tumor como se contempla por la presente invención como estructuras diana en la inmunoterapia tumoral, en particular, en la vacunación tumoral son las proteínas de superficie celular de la familia claudina, tales como CLDN6 y CLDN18.2, y PLAC1. CLDN18.2 se expresa selectivamente en tejidos normales en células epiteliales diferenciadas de la mucosa gástrica, mientras que CLDN6 y PLAC1 se describen como productos de expresión específicos de la placenta. Estos antígenos de diferenciación se expresan en tumores de diversos orígenes como se describe en la presente descripción más abajo, y son particularmente adecuados como estructuras diana para el desarrollo de estrategias de vacunación activas en relación con la inmunoterapia del cáncer mediada por anticuerpos debido a su expresión selectiva (sin expresión en un tejido normal de toxicidad relevante) y localización en la membrana plasmática.
- Los términos "tejido normal" o "condiciones normales" se refieren a tejido sano o a las condiciones en un sujeto sano, es decir, afecciones no patológicas, en donde "sano" significa, preferentemente, no tumorigénico o no canceroso.
- El término "expresado específicamente" significa que una proteína se expresa esencialmente solo en un tejido u órgano específico. Por ejemplo, un antígeno asociado a tumor expresado específicamente en la mucosa gástrica significa que dicha proteína se expresa primariamente en la mucosa gástrica, y no se expresa en otros tejidos o no se expresa de forma significativa en otros tipos de tejidos u órganos. Por lo tanto, una proteína que se expresa exclusivamente en las células de la mucosa gástrica y en un grado significativamente menor en cualquier otro tejido, tal como el testículo, se expresa específicamente en las células de la mucosa gástrica. En algunas modalidades, el antígeno asociado a tumor, además, puede expresarse específicamente en condiciones normales en más de un tipo de tejido u órgano, tal como en 2 o 3 tipos de tejidos u órganos, pero preferentemente, en no más de 3 tipos de tejidos u órganos diferentes. En este caso, entonces el antígeno asociado a tumor se expresa específicamente en estos órganos. Por ejemplo, si un antígeno asociado a tumor se expresa en condiciones normales, preferentemente, en una extensión aproximadamente igual en pulmón y estómago, dicho antígeno asociado a tumor se expresa específicamente en pulmón y estómago.
- El término "proteína propia" en relación con un sujeto particular en el contexto de la presente invención significa una proteína que está codificada por el genoma de dicho sujeto y que en condiciones normales, es decir, condiciones no patológicas, se expresa opcionalmente en ciertos tipos de tejidos normales o en ciertas etapas del desarrollo de dicho sujeto. Preferentemente, no incluye proteínas con mutaciones adquiridas. Un antígeno asociado a tumor que es una proteína propia en un sujeto incluye un antígeno asociado a tumor que es o fue expresado en dicho sujeto en condiciones normales en ciertos tejidos o en una determinada etapa del desarrollo y se expresa anormalmente o de manera aberrante en el tejido tumorigénico de dicho sujeto, preferentemente, en la misma forma y/o con la misma estructura. Un "autoanticuerpo" es un anticuerpo que reacciona con las células, tejidos o proteínas naturales del individuo en el que se produce, es decir, que reacciona con proteínas propias de dicho individuo.
- El término "tolerancia a lo propio" designa un mecanismo, donde el cuerpo no genera una respuesta inmunitaria a las proteínas propias. Normalmente, la tolerancia a lo propio se desarrolla precozmente mediante eventos del desarrollo dentro del sistema inmunitario que impiden, en particular, que las propias células T y B del organismo reaccionen con los propios tejidos del organismo.
- El término "una porción extracelular de un antígeno asociado a tumor" en el contexto de la presente invención se refiere a una parte de un antígeno asociado a tumor que sobresale al espacio extracelular de una célula y que es, preferentemente, asequible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por anticuerpos localizados en el exterior de la célula. Preferentemente, el término se refiere a un lazo extracelular o una parte de este o cualquier otra parte extracelular de un antígeno asociado a tumor que es, preferentemente, específico para dicho antígeno asociado a tumor. Preferentemente, dicha parte comprende al menos 5, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, o al menos 50 aminoácidos o más.
- El término "antígeno asociado a tumor relacionado con la superficie de una célula" significa que el antígeno asociado a tumor se localiza y se relaciona con la membrana plasmática de dicha célula, en donde al menos una parte del antígeno asociado al tumor sobresale al espacio extracelular de dicha célula y es asequible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, mediante anticuerpos localizados en el exterior de la célula. En este contexto, una parte es preferentemente al

menos 4, preferentemente al menos 8, preferentemente al menos 12, más preferentemente al menos 20 aminoácidos. La asociación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la asociación puede ser mediante uno o más dominios transmembrana, uno o más anclajes lipídicos, o mediante la interacción con cualquier otra proteína, lípido, sacárido u otra estructura que pueda encontrarse en la capa externa de la membrana plasmática de una célula. Por ejemplo, un antígeno asociado a tumor relacionado con la superficie de una célula puede ser una proteína transmembrana que tiene una porción extracelular o puede ser una proteína relacionada con la superficie de una célula mediante la interacción con otra proteína que es una proteína transmembrana.

El término "epítipo derivado de un antígeno asociado a tumor", significa, por ejemplo, un epítipo que es una porción o una parte del antígeno asociado a tumor, preferentemente, una porción o una parte del antígeno asociado a tumor que es específico para el antígeno asociado a tumor, o una variante o derivado de este, preferentemente, una variante o derivado de este que es inmunológicamente equivalente. Preferentemente, es posible identificar el antígeno asociado al tumor del cual se deriva el epítipo basado en la secuencia del epítipo. En el contexto del término "un tumor derivado de un tejido específico", el término "derivado de" significa "originado a partir de".

De acuerdo con la invención, el término "tumor" o "enfermedad tumoral" se refiere a una hinchazón o lesión que se forma por un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas o células tumorales). Por "célula tumoral" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa creciendo después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una pérdida parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser benigna, premaligna o maligna.

Preferentemente, una enfermedad tumoral, de acuerdo con la enseñanza, es una enfermedad cancerosa, es decir, una enfermedad maligna y una célula tumoral es una célula cancerosa. Preferentemente, una enfermedad tumoral se caracteriza por células en las que un antígeno, es decir, un antígeno asociado a tumor, preferentemente, un antígeno asociado a tumor como se definió anteriormente, se expresa o se expresa de manera aberrante. Preferentemente, una enfermedad tumoral o una célula tumoral se caracterizan por la expresión de un antígeno asociado a tumor en la superficie. En una modalidad preferida de la presente invención, el tumor o la célula cancerosa se identifican mediante un antígeno asociado a tumor relacionado con la superficie celular, tal como CLDN6, CLDN18.2, o PLAC1.

De acuerdo con la invención "expresión aberrante" o "expresión anormal" significa que la expresión está alterada, preferentemente aumentada, en comparación con el estado en una célula normal no tumorigénica o un individuo sano, es decir, en un individuo que no tiene una enfermedad asociada con la expresión aberrante o anormal de una cierta proteína, por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor. Un aumento de la expresión se refiere a un aumento de al menos el 10 %, en particular al menos el 20 %, al menos el 50 % o al menos el 100 %, o más. En una modalidad, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime.

Preferentemente, una enfermedad tumoral de acuerdo con la enseñanza es el cáncer, en donde el término "cáncer" de acuerdo con la invención comprende leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer rectal, cáncer de endometrio, cáncer renal, cáncer adrenal, cáncer de tiroides, cáncer de la sangre, cáncer de piel, cáncer del cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer intestinal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de garganta, nariz, y oídos (ENT), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario, y cáncer de pulmón, y las metástasis de estos. Los ejemplos de estos son carcinomas de pulmón, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas de colon, carcinomas de células renales, carcinomas cervicales, o metástasis de los tipos de cáncer o tumores descritos anteriormente. El término "cáncer" de acuerdo con la presente invención comprende, además, las metástasis del cáncer.

Los antígenos asociados a tumor preferidos en el contexto de la presente invención son proteínas de la familia claudina, preferentemente, CLDN6 o CLDN18.2, o PLAC1.

Las claudinas son una familia de proteínas que son los componentes más importantes de las uniones estrechas, donde establecen la barrera paracelular que controla el flujo de moléculas en el espacio intercelular entre las células de un epitelio. Las claudinas son proteínas transmembranas que se extienden por la membrana 4 veces con el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, ambos localizados en el citoplasma. El primer lazo extracelular, denominado EC1 o ECL1, consta en promedio de 53 aminoácidos, y el segundo lazo extracelular, denominado EC2 o ECL2, consta de alrededor de 24 aminoácidos. En el contexto de la presente invención, las claudinas preferidas son CLDN6 (secs. con núms. de ident.: 3 y 4) y CLDN18.2 (secs. con núms. de ident.: 5 y 6). Se identificó que las CLDN6 y CLDN18.2 se expresan diferencialmente en tejidos tumorales, que los únicos tejidos normales que expresan CLDN18.2 son estómago y testículo, y que el único tejido normal que expresa CLDN6 es la placenta.

Por ejemplo, se encontró que CLDN18.2 se expresa en carcinoma pancreático, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico, carcinoma bronquial, carcinoma de mama y tumores ENT. CLDN18.2 es una diana valiosa para la prevención y/o tratamiento de tumores primarios, tales como cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, y cánceres de la vesícula biliar, y metástasis de estos, en particular, metástasis de cáncer gástrico

tales como tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y metástasis de ganglios linfáticos. Las células que expresan CLDN18.2 son, preferentemente, células cancerosas y, en particular, se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas tumorigénicas gástricas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y de vesícula biliar.

5 CLDN6 se ha encontrado que se expresa, por ejemplo, en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de vías biliares, cáncer de células renales y cáncer de vejiga urinaria. CLDN6 es una diana particularmente preferida para la prevención y/o tratamiento del cáncer de ovario, en particular, adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, 10 cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular, carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular, adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular, sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de las vías biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular, 15 carcinoma de células transicionales, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales que incluye carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, carcinoma embrionario testicular, y coriocarcinoma placentario, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la enfermedad de cáncer asociada con la expresión de CLDN6 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de ovario metastásico y cáncer de pulmón metastásico. Preferentemente, el cáncer de ovario es un carcinoma o un adenocarcinoma. Preferentemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma o un adenocarcinoma, y preferentemente, es un cáncer bronquiolar tal como un carcinoma bronquiolar o un adenocarcinoma bronquiolar. En una modalidad, la célula tumoral asociada con la expresión de CLDN6 es una célula de dicho cáncer.

25 PLAC1 (secs. con núms. de ident.: 7 y 8) es un gen específico de la placenta que con frecuencia se activa de manera aberrante y se expresa altamente en una variedad de tipos de tumores, en particular cáncer de mama. El silenciamiento de PLAC1 mediado por ARNi en células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 afecta profundamente la motilidad, migración, e invasión e induce un bloqueo del ciclo celular en G1/S con abolición casi completa de la proliferación. La inactivación de PLAC1 se asocia con disminución de la expresión de ciclina D1 y reducción de la fosforilación de AKT quinasa. Además, PLAC1 se localiza en la superficie de las células cancerosas y es asequible para los anticuerpos que 30 antagonizan las funciones biológicas de esta molécula.

PLAC1 tiene numerosas propiedades que lo convierten en una diana altamente atractiva para anticuerpos terapéuticos y/o vacunación profiláctica y/o terapéutica. En el caso del cáncer de mama, por ejemplo, el 82 % de los pacientes portan esta diana. En cambio, Her2/neu, la diana del Herceptin, el único anticuerpo monoclonal (AcM) disponible para el 35 tratamiento de este tipo de cáncer, se sobreexpresa en solo 20-25 % de los pacientes con cáncer de mama (Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. y otros, (1989) Science 244, 707-712). Para el cáncer de pulmón y para el cáncer gástrico, en el que PLAC1 se expresa en el 42 y el 58 % de los casos, respectivamente, no existe un tratamiento de AcM aprobado hasta ahora, debido a la carencia de dianas apropiadas en estos tipos de cáncer. PLAC1 participa no solo en la proliferación, sino también en la motilidad celular, la migración y la invasión. 40

Se ha encontrado expresión de PLAC1 en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, cáncer hepático, sarcoma, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello. PLAC1 es una diana particularmente valiosa para la prevención y/o tratamiento de cáncer de mama, 45 cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa asociada con la expresión de PLAC1 es cáncer de mama o cáncer de pulmón, preferentemente, cáncer metastásico en el pulmón. 50

Los términos "un sujeto que porta un antígeno asociado a tumor" o "un sujeto que expresa un antígeno asociado a tumor" se usan indistintamente y significan que un antígeno asociado a tumor está presente en un sujeto, por ejemplo, en tejidos normales que expresan el antígeno asociado a tumor y/o en los tejidos tumorigénicos que expresan o expresan de manera aberrante el antígeno asociado a tumor. El término "una célula que porta un antígeno asociado a tumor" significa, 55 preferentemente, que dicha célula porta dicho antígeno asociado a tumor en su superficie, es decir, que el antígeno asociado a tumor se relaciona con la superficie de dicha célula.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que se reconoce por el sistema inmunitario, por ejemplo, que se reconoce por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítipos son los 60 sitios tridimensionales separados en un antígeno, que se reconocen por el sistema inmunitario. En el contexto de la presente invención, el epítipo se deriva, preferentemente, de una proteína, en particular una proteína propia. Un epítipo de una proteína tal como un antígeno asociado a tumor comprende, preferentemente, una porción continua o discontinua de dicha proteína y está, preferentemente, entre 5 y 100, preferentemente, entre 5 y 50, más preferentemente entre 8 y 30, con la máxima preferencia entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede ser, preferentemente, 65 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud. El epítipo en el contexto de la presente invención se deriva de un antígeno asociado a tumor, preferentemente, un antígeno asociado a tumor que es

una proteína propia en un sujeto que padece una enfermedad asociada con la expresión o la expresión aberrante de dicho antígeno asociado a tumor, por ejemplo, una enfermedad tumorigénica tal como cáncer. Es particularmente preferido que el epítipo en el contexto de la presente invención no sea un epítipo de células T. Preferentemente, el epítipo en el contexto de la presente invención es un epítipo de células B. La frase "el epítipo comprendido por el ácido nucleico de la presente invención o el vector de la presente invención" significa "el ácido nucleico que codifica el epítipo y que está comprendido por el ácido nucleico de la presente invención o el vector de la presente invención".

El término "una secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo" se refiere a una secuencia de aminoácidos que incluye la(s) secuencia(s) de aminoácidos de uno o más epítipos y puede incluir opcionalmente otras secuencias tales como secuencias enlazadoras. Si la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo comprende más de un epítipo, dichos epítipos pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Preferentemente, el epítipo se deriva de un antígeno asociado a tumor como se expuso anteriormente. La longitud de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo es, preferentemente, tal que cuando se inserta o se une a una proteína de HBcAg, la proteína de HBcAg quimérica aún es capaz de ensamblarse en partículas similares a virus. Por ejemplo, la longitud de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo puede ser de hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 50, hasta 100, hasta 150, hasta 200, hasta 250, o hasta 300 aminoácidos.

Una "secuencia enlazadora" es, preferentemente, una secuencia de aminoácidos que conecta otras dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, una parte de la proteína HBcAg puede conectarse con una parte de una secuencia de antígeno asociado a tumor, por ejemplo, una secuencia de epítipo, a través de una secuencia enlazadora. Una secuencia enlazadora preferida es G₄SG₄ (sec. con núm. de ident.: 24).

Los términos "producir una respuesta inmunitaria" e "inducir una respuesta inmunitaria" se usan indistintamente en el contexto de la presente invención y, preferentemente, se refieren a la inducción de una respuesta inmunitaria humoral. Una respuesta inmunitaria humoral comprende, preferentemente, la generación de anticuerpos específicos a un antígeno, en particular, de anticuerpos específicos a un epítipo. En el contexto de la presente invención, la respuesta inmunitaria humoral comprende, preferentemente, la generación de anticuerpos dirigidos contra un antígeno asociado a tumor, en donde, preferentemente, el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en el sujeto en el que se produce la respuesta inmunitaria humoral. Por lo tanto, en modalidades preferidas, los anticuerpos generados durante la respuesta inmunitaria humoral son autoanticuerpos, preferentemente, dirigidos contra el antígeno asociado a tumor en su conformación natural en la superficie de una célula, por ejemplo, una célula tumoral, preferentemente, una célula tumoral viva. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos generados durante una respuesta inmunitaria humoral son, preferentemente, capaces de producir funciones efectoras inmunitarias como se describe en la presente descripción. Preferentemente, dichas funciones efectoras inmunitarias se dirigen contra células que portan en su superficie el antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo. Por ejemplo, los anticuerpos generados son capaces de mediar la ADCC y/o la CDC contra tales células y/o inducen directamente la apoptosis o inhiben la proliferación de las células que portan el antígeno asociado a tumor en su superficie. Los términos "producir una respuesta inmunitaria" e "inducir una respuesta inmunitaria" pueden referirse, además, a la inducción de una respuesta inmunitaria celular y a la inducción de una respuesta inmunitaria celular y también humoral. La respuesta inmunitaria, preferentemente, la respuesta inmunitaria humoral, puede ser protectora/preventiva/profiláctica y/o terapéutica. "Que induce" puede significar que no hubo respuesta inmunitaria contra un antígeno particular antes de la inducción, pero puede significar, además, que hubo un cierto nivel de respuesta inmunitaria contra un antígeno particular antes de la inducción y después de la inducción se potencia dicha respuesta inmunitaria. Por lo tanto, "inducir la respuesta inmunitaria" en este contexto incluye, además, "potenciar la respuesta inmunitaria". Preferentemente, después de inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, dicho individuo está protegido contra el desarrollo de una enfermedad tal como una enfermedad cancerosa o la afección de la enfermedad se mejora mediante la inducción de una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, puede producirse una respuesta inmunitaria contra un antígeno asociado a tumor en un paciente que tiene cáncer o en un sujeto que está en riesgo de desarrollar cáncer. En este caso, producir una respuesta inmunitaria puede significar que el estado de la enfermedad del paciente mejora, que el paciente no desarrolla metástasis, o que el sujeto que está en riesgo de desarrollar cáncer no desarrolla cáncer.

Una "respuesta inmunitaria celular" o una "respuesta celular contra un antígeno" pretenden incluir una respuesta celular dirigida a células que se caracteriza por la presentación de un antígeno a través de las MHC de clase I o clase II. La respuesta celular se refiere a las células llamadas células T o linfocitos T que actúan como "cooperadores" o "asesinos". Las células T cooperadoras (además denominadas células T CD4⁺) desempeñan un papel central mediante la regulación de la respuesta inmunitaria y las células asesinas (además denominadas células T citotóxicas, células T citolíticas, células T CD8⁺ o CTL) destruyen a las células enfermas, tales como las células tumorales, lo que evita la producción de más células enfermas.

El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, o a una porción de unión a antígeno de estas. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y

cuatro FR, dispuestas desde el amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "funciones efectoras inmunitarias" en el contexto de la presente invención incluye cualquier función mediada por los componentes del sistema inmunitario que resulta en la inhibición del crecimiento tumoral y/o la inhibición del desarrollo tumoral, que incluye la inhibición de la diseminación tumoral y las metástasis. Preferentemente, las funciones efectoras inmunitarias resultan en la destrucción de células tumorales. Preferentemente, las funciones efectoras inmunitarias en el contexto de la presente invención son funciones efectoras mediadas por anticuerpos. Tales funciones comprenden la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), la inducción de apoptosis en las células que portan el antígeno asociado a tumor, por ejemplo, mediante la unión del anticuerpo a un antígeno de superficie, la inhibición de la transducción de señal mediada por CD40L, por ejemplo, mediante la unión del anticuerpo al receptor CD40 o al ligando de CD40 (CD40L), y/o la inhibición de la proliferación de las células que portan el antígeno asociado a tumor, preferentemente, la ADCC y/o la CDC. Por lo tanto, los anticuerpos que son capaces de mediar una o más funciones efectoras inmunitarias son, preferentemente, capaces de mediar la destrucción de las células mediante la inducción de lisis mediada por la CDC, lisis mediada por la ADCC, apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferentemente, mediante la inducción de lisis mediada por la CDC y/o lisis mediada por la ADCC. Además, los anticuerpos pueden ejercer un efecto simplemente mediante la unión a los antígenos asociados a tumor en la superficie de una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos pueden bloquear la función del antígeno asociado a tumor o inducir la apoptosis simplemente mediante la unión al antígeno asociado a tumor en la superficie de una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a PLAC1 en la superficie celular bloquean la proliferación de las células. En una modalidad preferida, el antígeno asociado a tumor es PLAC1 y las funciones efectoras que ejercen los anticuerpos inducidos contra PLAC1 comprenden la inhibición de la proliferación.

La ADCC describe la capacidad de las células efectoras, en particular linfocitos, para destruir células, que requieren, preferentemente, que la célula diana esté señalizada por un anticuerpo. La ADCC ocurre, preferentemente, cuando los anticuerpos se unen a los antígenos en las células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo se enlazan con los receptores Fc (FcR) en la superficie de las células efectoras inmunitarias. Se han identificado varias familias de receptores de Fc, y las poblaciones celulares específicas que expresan de manera característica los receptores definidos de Fc. La ADCC puede verse como un mecanismo para inducir directamente un grado variable de destrucción tumoral inmediata que conduce, además, a la presentación del antígeno y a la inducción de respuestas de células T dirigidas al tumor. Preferentemente, la inducción *in vivo* de la ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas a los tumores y, además, a respuestas de anticuerpos derivadas del huésped.

La CDC es otro método de destrucción celular que puede ser dirigido por anticuerpos. La IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. Además, las IgG1 e IgG3 son ambas muy efectivas para mediar la CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferentemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo resulta en la exposición de múltiples sitios de unión a C1q en estrecha proximidad en los dominios CH2 de las moléculas de anticuerpos participantes, tales como las moléculas IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferentemente, estas exposiciones de los sitios de unión a C1q convierten la interacción C1q-IgG, previamente de baja afinidad, en una interacción de alta avidéz, que dispara una cascada de eventos que implican una serie de otras proteínas del complemento y que conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos, y activadores de las células efectoras, C3a y C5a. Preferentemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque a la membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos dentro y fuera de la célula, y pueden conducir a la apoptosis.

El término "células efectoras inmunitarias" en el contexto de la presente invención se refiere a células que ejercen funciones efectoras durante una reacción inmunitaria. Por ejemplo, tales células secretan citocinas y/o quimiocinas, destruyen microbios, secretan anticuerpos, reconocen células infectadas o cancerosas, y opcionalmente eliminan tales células. Por ejemplo, las células efectoras inmunitarias comprenden células T (células T citotóxicas, células T cooperadoras, células T infiltrantes de tumor), células B, células asesinas naturales, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas.

El término "sujeto" e "individuo" se usa indistintamente y se refieren a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente invención son seres humanos, primates no humanos, animales domesticados tales como perros, gatos, ovejas, vacuno, cabras, cerdos, caballos, etc., animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, etc., así como también animales en cautiverio, tal como animales de zoológicos. El término "animal" como se usa en la presente descripción incluye, además, a los seres humanos. El término "sujeto" puede incluir, además, un paciente, es decir, un animal, preferentemente, un ser humano que tiene una enfermedad, preferentemente, una enfermedad asociada con la expresión o la expresión aberrante de un antígeno asociado a tumor tal como CLDN18.2, CLDN6, o PLAC1, preferentemente, una enfermedad tumorigénica tal como un cáncer. En modalidades preferidas, el sistema inmunitario del sujeto no está comprometido o no está esencialmente comprometido. Esto significa que en el sujeto están presentes las propiedades esenciales de un sistema inmunitario que funciona adecuadamente en el sujeto.

Esto incluye, en particular, que el sujeto es capaz de producir una reacción inmunitaria hacia un antígeno administrado que es comparable a una reacción inmunitaria que se esperaría de un individuo con un sistema inmunitario que funciona normalmente, por ejemplo, con respecto al tipo de reacción inmunitaria tal como la inducción de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, la fortaleza y/o duración de la reacción inmunitaria inducida, o la especificidad de la reacción inmunitaria inducida. Alternativa o adicionalmente, esto puede incluir que los mecanismos de tolerancia a lo propio se mantengan y estén presentes en dicho sujeto. Por ejemplo, estos mecanismos de tolerancia a lo propio podrían, por ejemplo, resultar en una supresión de una reacción inmunitaria contra un antígeno asociado a tumor que es una proteína propia si se administra como tal.

Como se usa en la presente descripción, el término "ácido nucleico" comprende ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), combinaciones de estos y formas modificadas de estos. El término comprende ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas recombinantemente y sintetizadas químicamente. De acuerdo con la invención, un ácido nucleico puede estar presente como una molécula monocatenaria o bicatenaria y lineal o en forma circular cerrada covalentemente.

Como se usa en la presente descripción, los términos "composición inmunogénica" y "composición vacunal" se usan indistintamente y se refieren a una preparación antigénica que comprende la proteína de acuerdo con la presente invención, preferentemente, en la forma de una partícula similar a virus. La composición inmunogénica puede administrarse a un sujeto para estimular el sistema inmunitario humoral y/o celular de dicho sujeto contra uno o más antígenos, preferentemente, contra uno o más antígenos asociados a tumor, que son, preferentemente, proteínas propias en dicho sujeto. Una composición inmunogénica en el contexto de la presente invención, preferentemente, ejerce su potencial inmunogénico sin la adición de adyuvantes y, preferentemente, se administra a un sujeto en cualquier ruta adecuada para producir una reacción inmunitaria protectora y/o terapéutica contra el antígeno, por ejemplo, el antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo que comprende la proteína de la presente invención. En una modalidad preferida, la composición inmunogénica descrita en la presente descripción es capaz de inducir la generación de anticuerpos contra el epítipo derivado de un antígeno asociado a tumor dentro del sujeto al que se administra dicha composición inmunogénica, en donde el antígeno asociado a tumor es, preferentemente, una proteína propia dentro de dicho sujeto. En otras palabras, en una modalidad particularmente preferida, la composición inmunogénica descrita en la presente descripción es capaz de producir una respuesta inmunitaria humoral que comprende la generación de autoanticuerpos contra un antígeno asociado a tumor que es una proteína propia en el sujeto al que se le administró la composición inmunogénica.

El término "ruptura de la tolerancia a lo propio" se refiere a cualquier procedimiento que causa que el sistema inmunitario de un sujeto genere una respuesta inmunitaria contra una proteína propia. Usualmente, las proteínas propias están protegidas del propio sistema inmunitario del sujeto debido a la tolerancia a lo propio. El sistema inmunitario reconoce las proteínas propias como "propias" y no ataca tales estructuras. Para los antígenos asociados a tumor, que a menudo son proteínas propias, esto significa que las células que portan dichos antígenos asociados a tumor no se reconocen como extrañas o enfermas y, por lo tanto, no son atacadas por el sistema inmunitario debido a la existencia de una tolerancia a lo propio hacia dichos antígenos. Por lo tanto, en el contexto de la terapia tumoral, se desea la ruptura de la tolerancia a lo propio existente hacia los antígenos asociados a tumor.

El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento que implica la activación de una reacción inmunitaria específica. En el contexto de la presente invención, los términos tales como "proteger", "prevenir", "profiláctico", "preventivo" o "protector" se refieren a la prevención o al tratamiento, o ambos, de la aparición y/o propagación de un tumor en un individuo. El término "inmunoterapia" en el contexto de la presente invención se refiere, preferentemente, a la inmunización activa contra el tumor o vacunación contra el tumor. Una administración profiláctica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración profiláctica de la composición inmunogénica de la invención, preferentemente, protege al receptor del desarrollo del crecimiento tumoral. Una administración terapéutica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración terapéutica de la composición inmunogénica de la invención, puede conducir a la inhibición del progreso/crecimiento del tumor. Esto comprende la desaceleración del progreso/crecimiento del tumor, en particular una interrupción de la progresión del tumor, que conduce, preferentemente, a la eliminación del tumor. Una administración terapéutica de una inmunoterapia puede proteger al individuo, por ejemplo, de la diseminación o metástasis de los tumores existentes.

El término "inmunización" o "vacunación" describe el proceso de administrar el antígeno a un sujeto con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria por razones terapéuticas o profilácticas.

El término "adyuvante" se refiere a compuestos que cuando se administran en combinación con un antígeno o antígeno peptídico a un individuo prolongan o potencian o aceleran la respuesta inmunitaria. La composición inmunogénica de la presente invención, preferentemente, ejerce su efecto inmunogénico sin adición de adyuvantes. Aun así, la composición inmunogénica de la presente invención puede contener cualquier adyuvante conocido. Se supone que los adyuvantes ejercen su actividad biológica por uno o más mecanismos, que incluyen un aumento de la superficie del antígeno, una prolongación de la retención del antígeno en el cuerpo, un retraso de la liberación del antígeno, el direccionamiento del antígeno a los macrófagos, el aumento de la absorción del antígeno, la mejora del procesamiento del antígeno, la estimulación de la liberación de citocinas, la estimulación y activación de células inmunitarias tales como células B, macrófagos, células dendríticas, células T y la activación inespecífica de células inmunitarias. Los adyuvantes comprenden un grupo heterogéneo de compuestos tales como emulsiones oleosas (por ejemplo, adyuvantes de Freund),

compuestos minerales (tal como alumbre), productos bacterianos (tal como la toxina de *Bordetella pertussis*), liposomas, y complejos inmunoestimulantes. Los ejemplos de adyuvantes son monofosforil lípido A (MPL SmithKline Beecham). Saponinas tales como QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18, y QS-L1 (So y otros, 1997, Mol. Cells 7: 178-186), adyuvantes incompleto de Freund, adyuvantes completo de Freund, vitamina E, montanide, alumbre, oligonucleótidos CpG (Krieg y otros, 1995, Nature 374: 546-549), ligandos Flt3 (DE 10 2008 061 522), y diversas emulsiones de agua en aceite que se preparan a partir de aceites biológicamente degradables tales como escualeno y/o tocoferol.

Los términos tales como "aumentar" o "potenciar", preferentemente, se refieren a un aumento o potenciación aproximadamente en al menos un 10 %, preferentemente al menos 20 %, preferentemente al menos 30 %, más preferentemente al menos 40 %, más preferentemente al menos 50 %, incluso más preferentemente al menos 80 %, y con la máxima preferencia al menos 100 %. Estos términos pueden relacionarse, además, con circunstancias, en donde en el tiempo cero no hay señal detectable para un cierto compuesto o condición, y en un punto de tiempo particular más tarde que el tiempo cero hay una señal detectable para un cierto compuesto o condición.

La composición inmunogénica descrita en la presente descripción se aplica generalmente en "cantidades farmacéuticamente aceptables" y en "preparaciones farmacéuticamente aceptables". Tales composiciones pueden contener sales, tampones, agentes conservantes, vehículos y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Las "sales farmacéuticamente aceptables" comprenden, por ejemplo, sales de adición de ácido que pueden formarse, por ejemplo, mediante la mezcla de una solución de compuestos con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico, o ácido fosfórico. Además, cuando el compuesto porta una porción ácida, las sales aceptables farmacéuticamente adecuadas de este pueden incluir sales de metal alcalino (por ejemplo, sales de sodio o potasio); sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio o magnesio); y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados (por ejemplo, amonio, amonio cuaternario y cationes de amina formados mediante el uso de contraaniones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo y sulfonato de arilo). Los ejemplos ilustrativos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, butirato, edetato de calcio, alcanfor, canfosulfonato, cansilato, carbonato, cloruro, citrato, clavulanato, ciclopentanopropionato, digluconato, dihidrocloruro, dodecilsulfato, edetato, edisilato, estolato, esilato, etanosulfonato, formiato, fumarato, gluceptato, glucoheptonato, gluconato, glutamato, glicerofosfato, glicolilarsanilato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobromuro, hidrocloreuro, hidrioduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, hidroxinaftoato, ioduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metanosulfonato, metilsulfato, mucato, 2-naftalenosulfonato, napsilato, nicotinato, nitrato, sal de amonio N-metilglucamina, oleato, oxalato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato/difosfato, picrato, pivalato, poligalacturonato, propionato, salicilato, estearato, sulfato, subacetato, succinato, tanato, tartrato, teoclato, tosilato, triioduro, undecanoato, valerato, y lo similar (ver, por ejemplo, S. M. Berge y otros, "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 66, pp. 1-19 (1977)).

El término "excipiente" cuando se usa en la presente descripción pretende indicar todas las sustancias en una formulación farmacéutica que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, vehículos, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes activos de superficie, conservantes, emulsionantes, tampones, agentes aromatizantes o colorantes.

Las composiciones inmunogénicas de acuerdo a la presente invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" en el contexto de la presente invención se refiere a uno o más rellenos o diluyentes sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para una administración a un ser humano. El término "vehículo" se refiere a un componente natural o sintético, orgánico o inorgánico que se combina con un componente activo para facilitar la aplicación del componente activo. Preferentemente, los componentes del vehículo son líquidos estériles tales como agua o aceites, que incluyen aquellos que se derivan de aceite mineral, de animales o plantas, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de girasol, etc. Además, pueden usarse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerina como compuestos de vehículos acuosos.

De acuerdo con la presente invención, la composición inmunogénica se administra en una cantidad con eficacia terapéutica. Una "cantidad con eficacia terapéutica" se refiere a una cantidad que, sola o en combinación con dosificaciones adicionales, resulta en una reacción deseada o un efecto deseado. En el caso de la terapia de una enfermedad particular o de una afección particular, la reacción deseada se refiere a la inhibición del progreso de la enfermedad. Esto comprende la desaceleración del progreso de la enfermedad, en particular una interrupción de la progresión de la enfermedad. La reacción deseada para una terapia de una enfermedad o afección puede ser, además, el retraso de la aparición o la inhibición de la aparición de la enfermedad o la afección. Una cantidad eficaz de la composición de acuerdo con la presente invención depende de la afección o enfermedad, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, que incluyen la edad, la condición fisiológica, la talla y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia acompañante opcionalmente, la ruta específica de administración y factores similares. En caso de que la reacción de un paciente sea insuficiente con una dosificación inicial, pueden aplicarse inmunizaciones múltiples o dosificaciones más altas (o dosificaciones efectivas más altas que pueden lograrse mediante una ruta de administración más localizada). En general, para un tratamiento o para una inducción o aumento de una reacción inmunitaria en un ser humano, preferentemente, las dosificaciones de la proteína de la presente invención,

preferentemente, de la partícula similar a virus de la presente invención, se formulan y se administran en el intervalo de 0.01 a 200 µg/kg de peso corporal, y preferentemente, en el rango de 0.1 a 100 µg/kg. En una modalidad preferida, se administran 50 µg a 2 mg, preferentemente, 600 µg de la partícula similar a virus de la invención a un paciente humano que tiene un peso corporal de aproximadamente 80 kg. Preferentemente, esta cantidad se administra tres veces, preferentemente, de acuerdo con un protocolo de inmunización estándar.

En una modalidad, las composiciones inmunogénicas descritas en la presente descripción se administran no más de cinco veces, no más de cuatro veces, no más de tres veces, o no más de dos veces durante un período de 40 días, 30 días, 20 días, 15 días o 10 días a partir de la primera administración de las composiciones inmunogénicas. En una modalidad, las composiciones inmunogénicas se administran tres veces, o dos veces durante un período de 30 días, 20 días, 15 días o 10 días a partir de la primera administración de las composiciones inmunogénicas. Preferentemente, esta administración de las composiciones inmunogénicas es seguida por una o más, preferentemente, por una única administración de refuerzo mediante el uso de las composiciones inmunogénicas que, preferentemente, se administran, no antes de 15 días, 20 días, 40 días, 50 días, o 60 días después de la última administración de las composiciones inmunogénicas o de la última administración de refuerzo.

El término "expresión" se usa en la presente descripción en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. La expresión puede ser transitoria o puede ser estable.

Como se usa en la presente descripción, el término "péptido" comprende oligo y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferentemente, tres o más, preferentemente cuatro o más, preferentemente seis o más, preferentemente ocho o más, preferentemente, diez o más, preferentemente 14 o más, preferentemente 16 o más, preferentemente 21 o más y hasta preferentemente, 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferentemente, a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y se usan indistintamente en la presente descripción.

Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que es posible inducir una respuesta inmunitaria humoral en un sujeto, es decir, inducir al sistema inmunitario de un sujeto a generar anticuerpos, en particular autoanticuerpos, contra antígenos asociados a tumor, en donde los anticuerpos generados son capaces de reconocer el antígeno asociado a tumor en su forma natural en la superficie de una célula y de ejercer funciones efectoras inmunitarias contra las células que portan dicho antígeno asociado a tumor. En particular, la presente invención utiliza partículas similares a virus compuestas de una proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B como vehículo para epítopos derivados de antígenos asociados a tumor.

Para todos los aspectos de la presente invención relacionada con la inducción de respuestas inmunitarias y/o tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de enfermedades tumorigénicas, debe entenderse que la respuesta inmunitaria se induce contra el antígeno asociado a tumor del cual se deriva el epítipo que se inserta o se une a ubicaciones específicas de la proteína HBcAg y que el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la enfermedad tumorigénica es con respecto a una enfermedad tumorigénica asociada con la expresión superficial del antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo. Por ejemplo, si el epítipo se deriva de CLDN6, la respuesta inmunitaria inducida y el tratamiento profiláctico y/o terapéutico se dirigen contra las células que expresan CLDN6, preferentemente las células tumorales que expresan CLDN6, y contra enfermedades tumorigénicas asociadas con la expresión de CLDN6. Lo mismo se aplica para CLDN18.2 y PLAC1 y cualquier otro antígeno asociado a tumor. Los tipos de tumores preferidos específicos para los antígenos específicos asociados a tumor se proporcionan en la presente descripción y se aplican a todos los aspectos de la presente invención.

En un aspecto, la presente invención describe una proteína que comprende toda o una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B e insertada en ella o unida a la misma una secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo, en donde el epítipo se deriva de una porción extracelular de un antígeno asociado a tumor relacionado con la superficie de una célula tumoral. Preferentemente, el antígeno asociado a tumor se expresa en un número limitado de tejidos y/u órganos específicos en condiciones normales, preferentemente en no más de 3, más preferentemente en no más de 2, más preferentemente en un tejido u órgano específico y se expresa o se expresa de manera aberrante en tejidos tumorales.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos que comprende el epítipo se inserta o se une a la secuencia de aminoácidos de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B o a una porción de esta, de manera que el epítipo asume al menos parcialmente su conformación natural. En este contexto, la conformación natural significa que el epítipo exhibe la misma estructura que asume dentro de su entorno natural, es decir, dentro del antígeno asociado a tumor del que se deriva, en condiciones naturales, es decir, en las condiciones en que se encuentra normalmente el antígeno asociado a tumor. El término "parcialmente" en este contexto puede significar que la estructura del epítipo dentro de la proteína HBcAg quimérica no es necesariamente 100 % idéntica a la estructura del epítipo dentro del antígeno asociado a tumor, pero que al menos puede identificarse una similitud significativa. Por lo tanto, preferentemente, los anticuerpos generados contra el epítipo dentro de la proteína de la presente invención son capaces de reconocer y unirse al antígeno asociado a tumor en su conformación natural, preferentemente, en la superficie de una célula, preferentemente, una célula tumoral, preferentemente, una célula tumoral viva, preferentemente, una célula tumoral viva

en su entorno natural. Preferentemente, el epítipo asume tal conformación que se produce una respuesta inmunitaria contra las células que portan el antígeno asociado a tumor en un sujeto que expresa el antígeno asociado a tumor cuando la proteína de la invención se administra a dicho sujeto, preferentemente, en la forma de una partícula similar a virus. Preferentemente, dicha respuesta inmunitaria se produce incluso cuando el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en dicho sujeto. En una modalidad preferida, la proteína de la presente invención es capaz de producir una respuesta inmunitaria, preferentemente, una respuesta inmunitaria humoral, contra el epítipo que se deriva del antígeno asociado a tumor en un sujeto, en contra de la tolerancia a lo propio que se produce hacia el antígeno asociado a tumor, que existe en dicho sujeto. Preferentemente, la proteína de la presente invención es capaz de producir dicha respuesta inmunitaria, preferentemente, en la forma de una partícula similar a virus, incluso cuando se administra sin adyuvante.

En una modalidad particularmente preferida de la proteína de la presente invención, dicha proteína es capaz de producir una respuesta inmunitaria humoral dirigida contra el antígeno asociado a tumor relacionado con la superficie de una célula, cuando se administra en la forma de partícula similar a virus, sin adyuvante, en un sujeto, en donde el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en dicho sujeto. Preferentemente, la respuesta inmunitaria humoral comprende la generación de anticuerpos, preferentemente, autoanticuerpos, que exhiben una o más funciones efectoras inmunitarias, preferentemente, contra células que portan el antígeno asociado a tumor en su conformación natural. Preferentemente, la una o más funciones inmunitarias efectoras se seleccionan del grupo que consiste en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), la inducción de apoptosis, la inhibición de la proliferación, y la inhibición de la transducción de señales mediada por CD40L, preferentemente, las funciones efectoras son la ADCC y/o la CDC.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente si una proteína cumple con los criterios anteriores. Por ejemplo, el experto en la técnica puede generar una proteína como se describió anteriormente que comprende un epítipo derivado de la porción extracelular de un antígeno asociado a tumor, tal como CLDN6, CLDN18.2 o PLAC1, mediante el uso, por ejemplo, de una secuencia de aminoácidos específica de ratón o conejo. El experto en la técnica puede entonces inmunizar conejos con una proteína que comprende el epítipo específico de conejo, o ratones con la proteína que comprende el epítipo específico de ratón, en donde la proteína, preferentemente, está en la forma de una partícula similar a virus y se administra, preferentemente, sin adyuvantes. El experto en la técnica conoce bien los esquemas de inmunización y pueden emplearse cualquiera de estos esquemas. Después de finalizada la inmunización, el suero puede extraerse de los animales y el suero puede analizarse para determinar las funciones efectoras mediadas por anticuerpos en las células, preferentemente, células tumorales, que expresan endógenamente o de manera exógena el antígeno asociado a tumor que tiene la secuencia de aminoácidos de las especies respectivas de las cuales se derivó el epítipo y donde se realizaron las inmunizaciones. Por ejemplo, pueden determinarse la destrucción de las células que portan el respectivo antígeno asociado a tumor en sus superficies, o la inhibición de la proliferación de tales células. Tales métodos se describen ilustrativamente en la sección de Ejemplos de la presente invención.

En una modalidad preferida particular, el antígeno asociado a tumor es CLDN18.2.

El epítipo está, preferentemente, entre 5 aminoácidos y la longitud completa de una parte continua de la porción extracelular del antígeno asociado a tumor y es, preferentemente, específico para dicho antígeno asociado a tumor. Por ejemplo, el epítipo puede estar entre 5 y 100, preferentemente entre 5 y 50, más preferentemente entre 8 y 30, con la máxima preferencia entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede ser preferentemente, de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

Las secuencias de epítopos particularmente preferidas en el contexto de la presente invención son para CLDN6 PMWKVTAFIGNSI (sec. con núm. de ident.: 9), MWKVTAFIGNSIVVA (sec. con núm. de ident.: 10), FIGNSIVVAQVVWE (sec. con núm. de ident.: 11), VVAQVVWEGLWMS (sec. con núm. de ident.: 12), VAQVVWEGLWMSVQSTGQMOC (sec. con núm. de ident.: 13), KVTAFIGNSIVVAQVV (sec. con núm. de ident.: 14), KVTAFIGNSIVVAQ (sec. con núm. de ident.: 15), RDFYNPLVAEAQK (sec. con núm. de ident.: 16), DFYNPLVAEAQ (sec. con núm. de ident.: 17), TAHAIIRDFYNPL (sec. con núm. de ident.: 18), DFYNPLVAEAQK (sec. con núm. de ident.: 19), y IRDFYNPLVAEAQKRE (sec. con núm. de ident.: 20), para CLDN18.2 TQDLYNNPVT (sec. con núm. de ident.: 21), DLYNNPVTAVFNYQGL (sec. con núm. de ident.: 45), NNPVTAVFNYQ (sec. con núm. de ident.: 46), VTAVFNYQGL (sec. con núm. de ident.: 47), SCVRESSGF (sec. con núm. de ident.: 48), VRESSGFT (sec. con núm. de ident.: 49), VRESSGFTE (sec. con núm. de ident.: 50), RGYFTLLGL (sec. con núm. de ident.: 51), ECRGYFTLLGL (sec. con núm. de ident.: 52), AVFNYQGLW RSCVRES (sec. con núm. de ident.: 53), DQWSTQDLYNNPVTAVFNYQ (sec. con núm. de ident.: 54), MDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGL (sec. con núm. de ident.: 55), WRSCVRESSGFTECRG YFTLLGLPAMLQAVR (sec. con núm. de ident.: 56), RIGSMEDSAKANMTLTS (sec. con núm. de ident.: 57), TNFWMSTANMYTGMGMVQTVQTRYTF (sec. con núm. de ident.: 58), y para PLAC1 VFSEEEHTQVP (sec. con núm. de ident.: 22), VFSEEEHTQV (sec. con núm. de ident.: 23), APQKSPWLTKP (sec. con núm. de ident.: 59), QKSPWLTKP (sec. con núm. de ident.: 60), APQKSPWLT (sec. con núm. de ident.: 61), MRVASKSR (sec. con núm. de ident.: 62), APQKSP (sec. con núm. de ident.: 63), TAQKDEK (sec. con núm. de ident.: 64), SKGTPSK (sec. con núm. de ident.: 65), APQKSPWLTK (sec. con núm. de ident.: 66), QKSPWLTK (sec. con núm. de ident.: 67), SMRVASKSRATAQKDEK (sec. con núm. de ident.: 68), PPNHVQPHAYQFTYRVT (sec. con núm. de ident.: 69), SMRVASKSRATAQKDE (sec. con núm. de ident.: 70), SMRVASKSRATA QKD (sec. con núm. de ident.: 71), SMRVASKSRATAQK (sec. con núm. de ident.: 72), RVASKSRATA (sec. con núm. de ident.: 73), YEVFSLSQSSQRPN (sec. con núm. de ident.: 74), EVFSLSQSSQR (sec. con núm. de ident.: 75), IDWFMVTVHPFMLNNDV (sec. con núm. de ident.: 76),

IDWFMVTVHPFMLNND (sec. con núm. de ident.: 77), IDWFMVTVHPFMLNN (sec. con núm. de ident.: 78), y variantes de estas.

5 En una modalidad preferida de la proteína de la presente invención, el epítipo comprende, preferentemente consiste esencialmente en, preferentemente consiste en

- (i) una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos expuestas en las secs. con núms. de ident.: 9 a 23 y 45 a 78 del listado de secuencias,
 10 (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, preferentemente, al menos 80 %, idéntica a la secuencia de aminoácidos en (i) preferentemente, en toda la longitud de la secuencia del epítipo, y es inmunológicamente equivalente a la secuencia de aminoácidos en (i), o
 15 (iii) una secuencia de aminoácidos en (i) o (ii) que es truncada y es inmunológicamente equivalente a la secuencia de aminoácidos en (i). Dicho truncamiento puede ser en el extremo amino terminal o en el extremo carboxilo terminal y es, preferentemente, no más de 40 %, preferentemente, no más de 30 %, preferentemente, no más de 20 %, más preferentemente no más de 10 % de la longitud completa de la secuencia del epítipo.

Además, las variantes y/o derivados de estos epítipos se contemplan en la presente invención siempre que dichas variantes y/o derivados sean inmunológicamente equivalentes a los epítipos descritos específicamente. El experto en la técnica entenderá que las sustituciones, adiciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos individuales dentro del epítipo pueden no alterar significativamente las propiedades inmunológicas de dichos epítipos.

25 En una modalidad preferida de la proteína de la presente invención, la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B comprende, preferentemente consiste esencialmente en, o preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

- (i) la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 1 o una porción de esta de al menos 50 aminoácidos, preferentemente de al menos 60 aminoácidos, preferentemente de al menos 70 aminoácidos, preferentemente de al menos 80 aminoácidos, preferentemente de al menos 90 aminoácidos, preferentemente de al menos 100 aminoácidos, preferentemente de al menos 110 aminoácidos, preferentemente de al menos 120 aminoácidos, preferentemente de al menos 130 aminoácidos, preferentemente de al menos 140 aminoácidos, o
 30 (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica, preferentemente al menos 80 % idéntica, a la secuencia de aminoácidos o la porción de esta en (i) preferentemente en la longitud completa de la secuencia de aminoácidos o la porción de esta en (i). Preferentemente, la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B usada en la presente invención es funcionalmente equivalente a la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B que se produce naturalmente con respecto al ensamblaje en partículas similares a virus, preferentemente, en la forma convencional de las partículas similares a virus del antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B, es decir, se conforman de 180 o 240 subunidades y que tienen una estructura icosaédrica.

40 En una modalidad particularmente preferida, la proteína HBcAg o la porción de esta tiene un truncamiento en el extremo carboxilo terminal en una posición de aminoácido hasta, y que incluye, la posición 140 de la sec. con núm. de ident.: 1 o una posición de aminoácido correspondiente. Por ejemplo, el truncamiento carboxilo terminal puede estar en, e incluye, la posición 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 45 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, o 183 de la sec. con núm. de ident.: 1 o un aminoácido correspondiente. Un truncamiento carboxilo terminal en, y que incluye, la posición 140 de la sec. con núm. de ident.: 1 significa que los aminoácidos desde la posición 140 hasta el extremo carboxilo terminal faltan en esta variante o porción de HBcAg particular, es decir, que esta variante o porción de proteína HBcAg puede consistir en los aminoácidos 1 a 139 de la sec. con núm. de ident.: 1. "Una posición de aminoácido correspondiente" en este contexto significa que si la proteína de la presente invención comprende una proteína HBcAg distinta de la proteína HBcAg expuesta en la sec. con núm. de ident.: 1, por ejemplo, una variante que se produce naturalmente que tiene una inserción, adición y/o deleción, el aminoácido en la posición 140 de la sec. con núm. de ident.: 1 puede no corresponderse con el aminoácido en la posición 140 de dicha variante de HBcAg que se produce naturalmente, sino a una posición con un número inferior o superior. Los aminoácidos correspondientes pueden determinarse como se describió anteriormente, 55 por ejemplo, mediante alineamiento de secuencia.

60 En una modalidad preferida particular de la proteína de la presente invención, la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B tiene un truncamiento en el extremo carboxilo terminal de manera que no puede unirse a los ácidos nucleicos, pero conserva la capacidad de ensamblarse en partículas similares a virus. La mayor actividad de reconocimiento de ARN se atribuyó a una región dentro de la proteína HBcAg correspondiente a los aminoácidos 150 a 157 de la sec. con núm. de ident.: 1. La mayor actividad de reconocimiento de ADN se atribuyó a una región dentro de la proteína HBcAg correspondiente a los aminoácidos 157 a 177 de la sec. con núm. de ident.: 1. Por lo tanto, para abolir la capacidad de unión a ácido nucleico de la proteína HBcAg, estas secuencias responsables de la unión de ácidos nucleicos se eliminan, preferentemente.

65

Una variante de truncamiento particularmente preferida de la proteína HBcAg usada en la presente invención es un truncamiento en, y que incluye, la posición del aminoácido 151 de la sec. con núm. de ident.: 1 o una posición de aminoácido correspondiente, es decir, una variante de proteína HBcAg cuyo aminoácido carboxilo terminal corresponde al aminoácido en la posición 150 de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 1. En una modalidad preferida, dicha variante de truncamiento de la proteína HBcAg comprende, además, una etiqueta His carboxilo terminal, preferentemente, unida a la variante de truncamiento de HBcAg a través de un enlazador de glicina tal como un enlazador GGS. Preferentemente, dicha variante de truncamiento de la proteína HBcAg comprende, esencialmente consiste en, o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 79. Preferentemente, dicha variante de truncamiento de la proteína HBcAg está codificada por un ácido nucleico expuesto en la sec. con núm. de ident.: 80.

En modalidades preferidas de la proteína de la presente invención, se elimina toda o parte de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la MIR de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B. Por ejemplo, todos o parte de los aminoácidos 74 a 89 de la sec. con núm. de ident.: 1 pueden eliminarse.

En una modalidad preferida de la proteína de la presente invención, la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo

(i) se une al aminoácido amino terminal de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, se inserta en el residuo de aminoácido 30 del extremo amino terminal, preferentemente, en el residuo de aminoácido 20 del extremo amino terminal, preferentemente, en el residuo de aminoácido 10 del extremo amino terminal, preferentemente, en el residuo de aminoácido 5 del extremo amino terminal de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, o reemplaza uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos, de los 30 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal, preferentemente, de los 20 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal, preferentemente, de los 10 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal, de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, y/o

(ii) se une al aminoácido carboxilo terminal de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B o se inserta en el residuo de aminoácido 30 en el extremo carboxilo terminal, preferentemente, en el residuo de aminoácido 20 carboxilo terminal, preferentemente en el residuo de aminoácido 10 carboxilo terminal de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, o reemplaza uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos, de los 30 residuos de aminoácidos del extremo carboxilo terminal, preferentemente, de los 20 residuos de aminoácidos del extremo carboxilo terminal, preferentemente, de los 10 residuos de aminoácidos de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, y/o

(iii) se inserta en la secuencia de aminoácidos correspondiente a la MIR de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B o reemplaza uno o más aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 aminoácidos, dentro de la secuencia de aminoácidos correspondientes a la MIR de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, y/o

(iv) se une a uno o más aminoácidos localizados dentro de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la MIR de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, por ejemplo, a uno o más de los aminoácidos 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 o 89 de la sec. con núm. de ident.: 1 o un aminoácido correspondiente.

Si la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo se une al aminoácido amino terminal de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B o se inserta entre los residuos amino terminales, se prefiere que la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo tenga una longitud máxima de 50 residuos de aminoácidos, preferentemente, 40 residuos de aminoácidos, preferentemente, 30 residuos de aminoácidos. Se prefiere, además, que no se eliminen más de 9, preferentemente no más de 5, preferentemente no más de 4, preferentemente no más de 3 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B.

Particularmente se prefiere que la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo se inserte en la MIR o reemplace uno o más aminoácidos la MIR. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo

(i) se inserta dentro de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B entre los aminoácidos en las posiciones 77 y 78 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 1 del listado de secuencias o en una posición correspondiente, o

(ii) reemplaza los aminoácidos en las posiciones 74-81, 76-81, 76-79, o 79-80 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 1 del listado de secuencias o en una posición correspondiente.

Se prefiere particularmente que la secuencia de aminoácidos que comprende el epítipo se inserte o se una a la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B de manera que la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B quimérica, es decir, la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B que comprende un epítipo derivado de un antígeno asociado a tumor, como se describió anteriormente, es capaz de ensamblarse en partículas similares a virus, preferentemente, en partículas similares a virus de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B convencionales. Esta característica de la proteína puede determinarse fácilmente por el experto, por ejemplo, mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión o fraccionamiento de flujo de campo asimétrico combinado con dispersión de luz dinámica, por ejemplo, como se describe en la sección de Ejemplos de la presente invención.

Además, se prefiere que la estructura, en particular la longitud, de la secuencia de aminoácidos que comprende el epítipo se escoja de manera que la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B quimérica, es decir, la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B que comprende un epítipo derivado de un antígeno asociado a tumor, como se describió anteriormente, es capaz de ensamblarse en partículas similares a virus. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo es, preferentemente, no más de 300, preferentemente, no más de 250, preferentemente, no más de 200, preferentemente, no más de 150, y más preferentemente no más de 100 aminoácidos de longitud. Se prefiere que la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo sea de hasta 100 residuos de aminoácidos de longitud, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 aminoácidos. Se prefiere particularmente que la longitud de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo esté entre 20 y 60 aminoácidos, preferentemente, entre 25 y 55 aminoácidos, por ejemplo, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, o 55 aminoácidos.

En algunas modalidades de la proteína de la presente invención, la proteína, además de la primera secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo, puede comprender una o más secuencias de aminoácidos adicionales que comprenden un epítipo insertado en, o unido a la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, en donde uno o más de los epítopos de la una o más secuencias de aminoácidos adicionales que comprenden un epítipo son idénticos o diferentes entre sí, y uno o más de los epítopos de la una o más secuencias de aminoácidos adicionales que comprenden un epítipo son idénticos o diferente del epítipo de la primera secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo. Estas una o más secuencias de aminoácidos adicionales que comprenden un epítipo pueden insertarse en, o unirse a, la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B como se describió anteriormente para la primera secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo. La descripción sobre la longitud de la primera secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo así como también sobre el epítipo, etcétera, se aplica, además, a la una o más secuencias de aminoácidos adicionales que comprenden un epítipo. Se prefiere particularmente, que una proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B quimérica que comprende más de una secuencia de aminoácidos que comprenden un epítipo sea capaz de ensamblarse en partículas similares a virus.

En algunas modalidades de la proteína de la presente invención, la primera secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo y/o una o más de las secuencias de aminoácidos adicionales que comprenden un epítipo comprende(n) más de un epítipo, en donde los epítopos son idénticos o diferentes. Por ejemplo, un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende más de un epítipo puede derivarse de un antígeno asociado a tumor y el otro epítipo puede derivarse de otro antígeno asociado a tumor. Esto es particularmente ventajoso si un cierto tipo de tumor puede reconocerse mediante una combinación de antígenos asociados a tumor. Los epítopos dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende más de un epítipo pueden derivarse, además, del mismo antígeno asociado a tumor. En este caso, los epítopos pueden derivarse, por ejemplo, de diferentes lazos extracelulares o porciones del antígeno asociado a tumor o del mismo lazo o porción extracelular.

La proteína de la presente invención puede comprender una o más secuencias enlazadoras entre los elementos individuales que constituyen las proteínas, por ejemplo, las partes derivadas de la proteína HBcAg y la secuencia(s) de aminoácidos que comprende un epítipo. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo comprende, además, una secuencia enlazadora en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la secuencia del epítipo. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo se inserta en, o reemplaza todo o parte de la MIR de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B, en particular si reemplaza toda la MIR o una parte principal de esta, es particularmente preferido que el epítipo esté flanqueado por secuencias enlazadoras en cada lado del epítipo.

Preferentemente, el enlazador consiste en un máximo de 50 aminoácidos, preferentemente de un máximo de 40 aminoácidos, más preferentemente de un máximo de 30 aminoácidos, incluso más preferentemente de un máximo de 20 aminoácidos, y con la máxima preferencia de un máximo de 10 aminoácidos. Es particularmente preferido que el enlazador esté formado por entre 2 y 25 aminoácidos, preferentemente, entre 2 y 20 aminoácidos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos, con la máxima preferencia 9 aminoácidos. El enlazador preferentemente comprende, preferentemente consiste esencialmente en, preferentemente consiste en aminoácidos pequeños tales como glicina, alanina o serina. Preferentemente, el enlazador se escoge de manera que las secuencias de aminoácidos unidas, por ejemplo, la secuencia del epítipo, sea capaz de asumir, al menos parcialmente, su estructura natural en condiciones naturales. Un enlazador preferido consiste esencialmente en residuos de glicina y serina, por ejemplo, que tienen una longitud de entre 5 y 15 aminoácidos, por ejemplo, los enlazadores preferidos son Gly_mSer_nGly_p, en donde m, n, y p son números enteros seleccionados independientemente a partir de 1 a 10, en donde m+n+p está entre 5 y 15. Un enlazador particularmente preferido es G₄SG₄ (sec. con núm. de ident.: 24). En modalidades en donde la secuencia del epítipo está flanqueada por secuencias enlazadoras, puede considerarse que las secuencias enlazadoras están comprendidas por la porción HBcAg de la proteína de la presente invención, por la secuencia de aminoácidos que comprende una porción del epítipo de la proteína de la presente invención, o una de las dos secuencias enlazadoras puede considerarse comprendida por la porción de HBcAg de la proteína de la presente invención y la otra secuencia enlazadora por la secuencia de aminoácidos que comprende una porción del epítipo de la proteína de la presente invención.

En algunas modalidades, la proteína de la presente invención puede comprender una o más etiquetas de epítipo, péptido o proteína, por ejemplo, para facilitar la purificación de la proteína de la presente invención. Tales etiquetas de epítipo, péptido o proteína incluyen, pero no se limitan a, hemaglutinina- (HA-), FLAG-, etiqueta myc, etiqueta poli-His, etiquetas

de glutatión-S-transferasa- (GST-), de proteína de unión a maltosa- (MBP-), NusA-, y tioredoxina, o etiquetas de proteínas fluorescentes tales como proteína fluorescente verde (mejorada) ((E)GFP), proteína fluorescente amarilla (mejorada) ((E)YFP), proteína fluorescente roja (RFP) derivada de especies *Discosoma* (DsRed) o monomérica (mRFP), proteína fluorescente cian (CFP), y similares. En una modalidad preferida, las etiquetas de epítipo, péptido o proteína pueden escindir-se de la proteína de la presente invención, por ejemplo, mediante el uso de una proteasa tal como trombina, Factor Xa, PreScission, proteasa TEV, y similares. Los sitios de reconocimiento para tales proteasas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Preferentemente, se usa una pequeña etiqueta de epítipo o péptido tal como una etiqueta His, una etiqueta HA o una etiqueta FLAG, y preferentemente, la etiqueta puede eliminarse. En una modalidad preferida, la proteína de la presente invención comprende una etiqueta His, preferentemente, una etiqueta His₆, preferentemente, en el extremo carboxilo. Preferentemente, la etiqueta de epítipo, péptido o proteína se conecta a uno o más de los otros elementos de la proteína de la presente invención a través de un enlazador, en donde el enlazador puede ser como se describió anteriormente. Un enlazador preferido en este contexto es la secuencia de aminoácidos GGS.

En modalidades preferidas de las proteínas HBcAg quiméricas de la presente invención, la secuencia principal de HBcAg se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos expuestas en las secs. con núms. de ident.: 25 a 30, es decir, las cadenas principales A, B, C, D, E, y F de HBcAg (Figura 7). Las secuencias de ácido nucleico preferidas que codifican para las cadenas principales de HBcAg son las secuencias de ácido nucleico expuestas en las secs. con núms. de ident.: 31 a 36, en donde la sec. con núm. de ident.: 31 codifica para la sec. con núm. de ident.: 25, la sec. con núm. de ident.: 32 codifica para la sec. con núm. de ident.: 26, la sec. con núm. de ident.: 33 codifica para la sec. con núm. de ident.: 27, la sec. con núm. de ident.: 34 codifica para la sec. con núm. de ident.: 28, la sec. con núm. de ident.: 35 codifica para la sec. con núm. de ident.: 29 y la sec. con núm. de ident.: 36 codifica para la sec. con núm. de ident.: 30. El término "cadena principal de HBcAg" se refiere a la porción de la proteína de la invención que no es la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo. Se prefiere particularmente que estas cadenas principales se combinen con secuencias de aminoácidos que comprenden una o más de las secuencias de epítipo expuestas en las secs. con núms. de ident.: 9 a 23 y 45 a 78 del listado de secuencias. Por ejemplo, la cadena principal A de HBcAg (sec. con núm. de ident.: 25) puede combinarse con una secuencia de aminoácidos que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 11, sec. con núm. de ident.: 12, sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 16, sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 19, sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 47, sec. con núm. de ident.: 48, sec. con núm. de ident.: 49, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 51, sec. con núm. de ident.: 52, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con núm. de ident.: 54, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.: 56, sec. con núm. de ident.: 57, sec. con núm. de ident.: 58, sec. con núm. de ident.: 59, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 61, sec. con núm. de ident.: 62, sec. con núm. de ident.: 63, sec. con núm. de ident.: 64, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 66, sec. con núm. de ident.: 67, sec. con núm. de ident.: 68, sec. con núm. de ident.: 69, sec. con núm. de ident.: 70, sec. con núm. de ident.: 71, sec. con núm. de ident.: 72, sec. con núm. de ident.: 73, sec. con núm. de ident.: 74, sec. con núm. de ident.: 75, sec. con núm. de ident.: 76, sec. con núm. de ident.: 77 o sec. con núm. de ident.: 78, la cadena principal B de HBcAg (sec. con núm. de ident.: 26) puede combinarse con una secuencia de aminoácidos que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 11, sec. con núm. de ident.: 12, sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 16, sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 19, sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 47, sec. con núm. de ident.: 48, sec. con núm. de ident.: 49, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 51, sec. con núm. de ident.: 52, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con núm. de ident.: 54, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.: 56, sec. con núm. de ident.: 57, sec. con núm. de ident.: 58, sec. con núm. de ident.: 59, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 61, sec. con núm. de ident.: 62, sec. con núm. de ident.: 63, sec. con núm. de ident.: 64, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 66, sec. con núm. de ident.: 67, sec. con núm. de ident.: 68, sec. con núm. de ident.: 69, sec. con núm. de ident.: 70, sec. con núm. de ident.: 71, sec. con núm. de ident.: 72, sec. con núm. de ident.: 73, sec. con núm. de ident.: 74, sec. con núm. de ident.: 75, sec. con núm. de ident.: 76, sec. con núm. de ident.: 77 o sec. con núm. de ident.: 78, la cadena principal C de HBcAg (sec. con núm. de ident.: 27) puede combinarse con una secuencia de aminoácidos que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 11, sec. con núm. de ident.: 12, sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 16, sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 19, sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 47, sec. con núm. de ident.: 48, sec. con núm. de ident.: 49, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 51, sec. con núm. de ident.: 52, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con núm. de ident.: 54, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.: 56, sec. con núm. de ident.: 57, sec. con núm. de ident.: 58, sec. con núm. de ident.: 59, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 61, sec. con núm. de ident.: 62, sec. con núm. de ident.: 63, sec. con núm. de ident.: 64, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 66, sec. con núm. de ident.: 67, sec. con núm. de ident.: 68, sec. con núm. de ident.: 69, sec. con núm. de ident.: 70, sec. con núm. de ident.: 71, sec. con núm. de ident.: 72, sec. con núm. de ident.: 73, sec. con núm. de ident.: 74, sec. con núm. de ident.: 75, sec. con núm. de ident.: 76, sec. con núm. de ident.: 77 o sec. con núm. de ident.: 78, la cadena principal D de HBcAg (sec. con núm. de ident.: 28) puede combinarse con una secuencia de aminoácidos que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 11, sec. con núm. de ident.: 12, sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 16, sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 19, sec. con núm. de ident.:

20, sec. con núm. de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 47, sec. con núm. de ident.: 48, sec. con núm. de ident.: 49, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 51, sec. con núm. de ident.: 52, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con núm. de ident.: 54, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.: 56, sec. con núm. de ident.: 57, sec. con núm. de ident.: 58, sec. con núm. de ident.: 59, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 61, sec. con núm. de ident.: 62, sec. con núm. de ident.: 63, sec. con núm. de ident.: 64, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 66, sec. con núm. de ident.: 67, sec. con núm. de ident.: 68, sec. con núm. de ident.: 69, sec. con núm. de ident.: 70, sec. con núm. de ident.: 71, sec. con núm. de ident.: 72, sec. con núm. de ident.: 73, sec. con núm. de ident.: 74, sec. con núm. de ident.: 75, sec. con núm. de ident.: 76, sec. con núm. de ident.: 77 o sec. con núm. de ident.: 78, la cadena principal E de HBcAg (sec. con núm. de ident.: 29) puede combinarse con una secuencia de aminoácidos que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 11, sec. con núm. de ident.: 12, sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 16, sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 19, sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 47, sec. con núm. de ident.: 48, sec. con núm. de ident.: 49, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 51, sec. con núm. de ident.: 52, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con núm. de ident.: 54, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.: 56, sec. con núm. de ident.: 57, sec. con núm. de ident.: 58, sec. con núm. de ident.: 59, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 61, sec. con núm. de ident.: 62, sec. con núm. de ident.: 63, sec. con núm. de ident.: 64, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 66, sec. con núm. de ident.: 67, sec. con núm. de ident.: 68, sec. con núm. de ident.: 69, sec. con núm. de ident.: 70, sec. con núm. de ident.: 71, sec. con núm. de ident.: 72, sec. con núm. de ident.: 73, sec. con núm. de ident.: 74, sec. con núm. de ident.: 75, sec. con núm. de ident.: 76, sec. con núm. de ident.: 77 o sec. con núm. de ident.: 78, la cadena principal F de HBcAg (sec. con núm. de ident.: 30) puede combinarse con la secuencia de aminoácidos que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 11, sec. con núm. de ident.: 12, sec. con núm. de ident.: 13, sec. con núm. de ident.: 14, sec. con núm. de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 16, sec. con núm. de ident.: 17, sec. con núm. de ident.: 18, sec. con núm. de ident.: 19, sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 47, sec. con núm. de ident.: 48, sec. con núm. de ident.: 49, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 51, sec. con núm. de ident.: 52, sec. con núm. de ident.: 53, sec. con núm. de ident.: 54, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.: 56, sec. con núm. de ident.: 57, sec. con núm. de ident.: 58, sec. con núm. de ident.: 59, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 61, sec. con núm. de ident.: 62, sec. con núm. de ident.: 63, sec. con núm. de ident.: 64, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 66, sec. con núm. de ident.: 67, sec. con núm. de ident.: 68, sec. con núm. de ident.: 69, sec. con núm. de ident.: 70, sec. con núm. de ident.: 71, sec. con núm. de ident.: 72, sec. con núm. de ident.: 73, sec. con núm. de ident.: 74, sec. con núm. de ident.: 75, sec. con núm. de ident.: 76, sec. con núm. de ident.: 77 o sec. con núm. de ident.: 78. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo se inserta en la cadena principal HBcAg entre la secuencia enlazadora GGGGSGGGG (sec. con núm. de ident.: 24) y la porción de HBcAg, es decir, inmediatamente en el extremo 5' o en el extremo 3' de esta secuencia enlazadora. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo comprende, además, una secuencia enlazadora, en donde si la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo se inserta en el extremo 5' de la secuencia enlazadora de la cadena principal de HBcAg, la secuencia enlazadora de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo se localiza en el extremo 5' de la secuencia del epítipo, y si la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo se inserta en el extremo 3' de la secuencia enlazadora de la cadena principal de HBcAg, la secuencia enlazadora de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo se localiza en el extremo 3' de la secuencia del epítipo. Por lo tanto, en las modalidades preferidas, el epítipo está flanqueado por secuencias enlazadoras dentro de las proteínas de HBcAg quiméricas de la invención. Debe entenderse que, por ejemplo, la etiqueta His localizada en el extremo C terminal de las cadenas principales de HBcAg puede reemplazarse por cualquier otra etiqueta de epítipo, péptido o proteína como se describió anteriormente, y que las secuencias enlazadoras, además, pueden variar según como se describió anteriormente.

En una modalidad particularmente preferida de la proteína de la presente invención, el epítipo es el péptido ³²⁻⁴¹ de CLDN18.2 que tiene la secuencia TQDLYNNPVT (sec. con núm. de ident.: 21) que está flanqueada en ambos lados por un enlazador, preferentemente, que tiene la secuencia Gly_mSer_nGly_p, en donde m, n, y p son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 10, en donde m+n+p está entre 5 y 15, más preferentemente, que tiene la secuencia G₄SG₄ (sec. con núm. de ident.: 24). El epítipo flanqueado en ambos lados por un enlazador (secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo) se inserta en una secuencia de la cadena principal de HBcAg, en donde la porción de la secuencia de la cadena principal de HBcAg que flanquea el lado N-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo, preferentemente, comprende la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 2 a 73, 2 a 75 o 2 a 78 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 73, 1 a 75 o 1 a 78 de la sec. con núm. de ident.: 1 y la porción de la secuencia de la cadena principal de HBcAg que flanquea el lado C-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo, preferentemente, comprende la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 80 a 150, 81 a 150 u 82 a 150 de la sec. con núm. de ident.: 1. Preferentemente, la porción de la secuencia de la cadena principal de HBcAg que flanquea el lado N-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo comprende la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 2 a 78 de la sec. con núm. de ident.: 1, preferentemente, la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 1 a 78 de la sec. con núm. de ident.: 1 y la porción de la secuencia de la cadena principal de HBcAg que flanquea el lado C-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo comprende la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 81 a 150 de la sec. con núm. de ident.: 1. En una modalidad, la porción de la secuencia de la cadena principal de HBcAg que flanquea el lado N-terminal

de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo puede comprender secuencias adicionales en su extremo N-terminal y/o la porción de la secuencia de la cadena principal de HBcAg que flanquea el lado C-terminal de la secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo puede comprender secuencias adicionales en su extremo C-terminal.

5 Los ejemplos particularmente preferidos de la proteína de la presente invención son proteínas que comprenden, preferentemente consisten esencialmente en, preferentemente consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

(i) las secuencias de aminoácidos expuestas en las secs. con núms. de ident.: 37 a 40 o

10 (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, preferentemente al menos 80 %, idéntica a la secuencia de aminoácidos en (i) preferentemente en 60 %, más preferentemente en al menos 70 %, más preferentemente en al menos 80 %, más preferentemente en al menos 90 %, con la máxima preferencia en al menos 95 % de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos en (i), y es funcionalmente, preferentemente, inmunológicamente equivalente a la secuencia de aminoácidos en (i). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos en (ii),
 15 preferentemente, es capaz de ensamblarse en partículas similares a virus y, preferentemente, es capaz de producir una respuesta inmunitaria, preferentemente, una respuesta inmunitaria humoral, en un sujeto contra el antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo, cuando se administra a dicho sujeto, preferentemente, en la forma de partículas similares a virus y sin adyuvante. Como se especificó anteriormente, los anticuerpos generados, preferentemente, son
 20 capaces de reconocer y unirse al antígeno asociado a tumor en su conformación natural, preferentemente, en la superficie de una célula, preferentemente, una célula tumoral. Preferentemente, dicha reacción inmunitaria se produce, además, cuando el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en el sujeto.

25 Las secuencias de ácido nucleico preferidas que codifican los ejemplos preferidos de la proteína de la presente invención son los ácidos nucleicos expuestos en las secs. con núms. de ident.: 41 a 44, en donde la sec. con núm. de ident.: 41 codifica para la sec. con núm. de ident.: 37, la sec. con núm. de ident.: 42 codifica para la sec. con núm. de ident.: 38, la sec. con núm. de ident.: 43 codifica para la sec. con núm. de ident.: 39 y la sec. con núm. de ident.: 44 codifica para la sec. con núm. de ident.: 40.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende, preferentemente, que consiste esencialmente en, que consiste, preferentemente, en un ácido nucleico que codifica la proteína de la invención. Los ejemplos particularmente preferidos de ácidos nucleicos que codifican la proteína de la presente invención se exponen en las secs. con núms. de ident.: 41 a 44. Además, las variantes de las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de la invención se contemplan en la presente invención como se describió anteriormente, siempre que la variante de proteína particular codificada por la variante de ácido nucleico sea funcionalmente, preferentemente, inmunológicamente equivalente a la proteína respectiva. En modalidades preferidas, los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención se optimizan con respecto al uso de codones. Por ejemplo, si la proteína de la presente invención es para expresarse en un huésped procariota, tal como *E. coli*, el polinucleótido que codifica la proteína de la presente descripción se optimiza, preferentemente, para el uso de codones procarióticos.

40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector, preferentemente, un vector recombinante, que comprende el ácido nucleico de la invención. "Recombinante" significa que dicho vector no se produce de forma natural, por ejemplo, que dicho vector se produce por ingeniería genética. Un vector en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector conocido por el experto en la técnica, que incluye vectores de plásmidos, vectores de cósmidos, vectores de fagos tales como fago lambda, vectores virales tales como vectores de adenovirus o baculovirus, o vectores cromosómicos artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) o cromosomas artificiales P1 (PAC). Dichos vectores incluyen vectores de expresión así como también vectores de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos así como también vectores virales y generalmente contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacteria, levadura, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión *in vitro*. Los vectores de clonación se usan generalmente para manipular y amplificar un cierto fragmento de ADN deseado y pueden carecer de las secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados. El experto en la técnica conoce bien las técnicas utilizadas para la incorporación de secuencias de polinucleótidos de interés en vectores (ver, además, Sambrook y otros, 1989, *más arriba*). Los vectores, por ejemplo, los plásmidos pueden incluir un origen de replicación (*ori*), un sitio de clonación múltiple, y secuencias reguladoras tales como promotores (constitutivos o inducibles), sitio de inicio de la transcripción, sitio de unión al ribosoma, sitio de terminación de la transcripción, señal de poliadenilación, y marcadores de selección tales como de resistencia a antibióticos o marcadores auxotróficos basados en la complementación de una mutación o delección. En una modalidad, la secuencia del polinucleótido de interés se une operativamente a las secuencias reguladoras.

60 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el polinucleótido de la invención o el vector de la invención. Las células huésped pueden ser células procariotas tales como arqueas o células bacterianas o células eucariotas tales como células de levadura, plantas, insectos o mamíferos. En una modalidad preferida, la célula huésped es una célula bacteriana tal como una célula de *E. coli*. El experto en la técnica conoce bien los métodos para introducir dicho polinucleótido o dicho vector en dicha célula huésped. Por ejemplo, las células bacterianas pueden transformarse fácilmente mediante el uso de, por ejemplo, la transformación química, por ejemplo, el

método de cloruro de calcio, o la electroporación. Las células de levadura pueden transformarse, por ejemplo, mediante el uso del método de transformación de acetato de litio o la electroporación. Otras células eucariotas pueden transfectarse, por ejemplo, mediante el uso de los kits de transfección basados en liposomas disponibles comercialmente, tales como Lipofectamine™ (Invitrogen), kits de transfección basados en lípidos disponibles comercialmente, tales como Fugene (Roche Diagnostics), la transfección basada en polietilenglicol, la precipitación con fosfato de calcio, la pistola de genes (biolística), la electroporación o la infección viral. En una modalidad preferida de la invención, la célula huésped expresa el polinucleótido de la invención. La proteína expresada puede ser soluble y/o expresarse en cuerpos de inclusión. La proteína de la invención puede purificarse mediante el uso de métodos de purificación de proteínas bien conocidos por los expertos en la técnica, mediante la ventaja que representan, opcionalmente, las etiquetas de epítipo, péptido o proteína mencionadas anteriormente. En una modalidad, la proteína de la presente invención se purifica en condiciones desnaturizantes. Después, la proteína de la invención puede ensamblarse *in vitro* en partículas similares a virus.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una partícula similar a virus que comprende múltiples copias, por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más copias de la proteína de la presente invención. En una modalidad preferida, la partícula similar a virus de la invención es capaz de producir una respuesta inmunitaria, preferentemente, una respuesta inmunitaria humoral dirigida contra el antígeno asociado a tumor en relación con la superficie de una célula, cuando se administra sin adyuvante a un sujeto, en donde el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en dicho sujeto. Es claro para un experto en la técnica que el antígeno asociado a tumor contra el que se dirige la respuesta inmunitaria humoral es el antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo que está comprendido por la proteína de la presente invención, que a su vez está comprendida en la partícula similar a virus de la presente invención.

La partícula similar a virus de la invención puede ser una partícula similar a virus de HBcAg convencional, por ejemplo, que consiste en 180 o 240 subunidades de proteína HBcAg que tiene, preferentemente, una estructura icosaédrica o puede asumir cualquier otra estructura de partícula similar a virus, por ejemplo, una estructura esférica, globular o en forma de varilla. Preferentemente, la partícula similar a virus consiste en 180 o 240 subunidades y tiene, preferentemente, una estructura icosaédrica.

En una modalidad, la partícula similar a virus de la invención está compuesta de proteínas antigénicas del núcleo del virus de la hepatitis B y múltiples copias de la proteína de la invención, en donde al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, preferentemente al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos 95 % de las subunidades de proteína son la proteína de la invención. Por ejemplo, la partícula similar a virus puede consistir en 180 subunidades de proteína, en donde 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, o 180 subunidades pueden ser la proteína de la invención.

Por ejemplo, la partícula similar a virus puede consistir en de 240 subunidades proteicas, en donde 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, o 240 subunidades pueden ser la proteína de la presente invención. La proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B en este contexto, preferentemente, es una proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B que ocurre naturalmente o una porción de esta, preferentemente, una porción truncada en el extremo carboxilo terminal de esta como se especificó anteriormente para la proteína de la presente invención. El antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B puede, además ser una variante manipulada genéticamente de una proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B que ocurre naturalmente o una porción de esta, preferentemente, siempre que la manipulación genética no modifique las propiedades funcionales, en particular no interfiera con la capacidad de la proteína antigénica del núcleo del virus de la hepatitis B para ensamblarse en partículas similares a virus.

En una modalidad particularmente preferida, el 100 % de las subunidades de proteína que componen la partícula similar a virus de la invención son la proteína de la presente invención. Por lo tanto, en una modalidad particularmente preferida, la partícula similar a virus de la presente invención se compone de múltiples copias de la proteína de la presente invención. Las proteínas individuales que componen la partícula similar a virus pueden comprender los mismos o diferentes epítopos derivados de un antígeno asociado a tumor único o diferente. Pueden comprender, además, la misma porción de HBcAg o una diferente, o la misma cadena principal de HBcAg o una diferente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, o la partícula similar a virus de la presente invención y un diluyente, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición inmunogénica es para producir una respuesta inmunitaria, preferentemente, una respuesta inmunitaria humoral contra el antígeno asociado a tumor en relación con la superficie de una célula en un sujeto, en donde el antígeno asociado a tumor es, preferentemente, una proteína propia en dicho sujeto. Es particularmente preferido que la composición inmunogénica de la presente invención esté libre de adyuvantes. Preferentemente, el efecto inmunogénico de la composición inmunogénica de la presente invención, por ejemplo, la generación de autoanticuerpos contra el antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo, puede observarse, además, cuando se administra a un sujeto sin la adición de adyuvantes. Sin embargo, la adición de adyuvantes, como se describió anteriormente, puede aumentar y/o prolongar el efecto inmunogénico.

En otros aspectos, la presente invención proporciona la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico

de tumores. En general, los tumores en el contexto de la presente invención, preferentemente, son tumores asociados con la expresión o la expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, en donde el antígeno asociado a tumor es como se definió anteriormente. Por ejemplo, el antígeno asociado a tumor es un antígeno de diferenciación, un antígeno de cáncer/testículo, un antígeno específico para tejidos trofoblásticos, o un antígeno específico de línea germinal. Preferentemente, la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención son para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad asociada con la expresión o la expresión anormal de un antígeno asociado a tumor, en donde el epítipo comprendido por la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención se derivan de dicho antígeno asociado a tumor.

Por ejemplo, si la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención comprenden un epítipo derivado de CLDN6, la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención son para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad asociada con la expresión o la expresión anormal de CLDN6, por ejemplo, una enfermedad tumorigénica, como se describió anteriormente. Preferentemente, la enfermedad tumorigénica es una enfermedad cancerosa, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en cáncer de ovario, en particular adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular carcinoma de células transicionales, cáncer renal, en particular carcinoma de células renales que incluye carcinoma renal de células claras y carcinoma renal de células papilares, cáncer de colon, carcinoma testicular embrionario, y coriocarcinoma placentario, y las formas metastásicas de estos. Es particularmente preferido que la enfermedad cancerosa se seleccione del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de ovario metastásico y cáncer de pulmón metastásico. Preferentemente, el cáncer de ovario es un carcinoma o un adenocarcinoma. Preferentemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma o un adenocarcinoma, y preferentemente, es un cáncer bronquiolar tal como un carcinoma bronquiolar o un adenocarcinoma bronquiolar.

Además, por ejemplo, si la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención comprenden un epítipo derivado de CLDN18.2, la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención son para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad asociada con la expresión o la expresión anormal de CLDN18.2, por ejemplo, una enfermedad tumorigénica, como se describió anteriormente. Preferentemente, la enfermedad tumorigénica es un cáncer, preferentemente un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, y cánceres de la vesícula biliar, y metástasis de estos, en particular metástasis de cáncer gástrico tales como tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y metástasis de ganglios linfáticos.

Además, por ejemplo, si la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención comprenden un epítipo derivado de PLAC1, la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención son para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad asociada con la expresión o la expresión anormal de PLAC1, por ejemplo, una enfermedad tumorigénica. Preferentemente, la enfermedad tumorigénica es un cáncer, preferentemente un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria humoral, contra un antígeno asociado a tumor en un sujeto, en donde el antígeno asociado a tumor es, preferentemente, una proteína propia en dicho sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención. Preferentemente, dicho sujeto está afectado con un tumor o está en riesgo de desarrollar un tumor, dicho tumor se caracteriza, preferentemente, por la relación del antígeno asociado a tumor con la superficie de una célula

tumoral. Preferentemente, dicho tumor se asocia con el antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo que está comprendido por la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención. En una modalidad preferida, el método comprende administrar la partícula similar a virus o la composición inmunogénica de la presente invención. Preferentemente, producir una respuesta inmunitaria humoral comprende la generación de anticuerpos, preferentemente autoanticuerpos, que reconocen/se unen específicamente al antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo en relación con la superficie de una célula, preferentemente, en la superficie de una célula viva, por ejemplo, una célula tumoral que porta/expresa el antígeno asociado a tumor. Preferentemente, los anticuerpos generados reconocen el antígeno asociado a tumor en su conformación natural en la superficie de una célula. Particularmente, se prefiere que los anticuerpos generados sean capaces de producir funciones efectoras contra células que portan en su superficie el antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo. Por ejemplo, los anticuerpos generados pueden ser capaces de mediar la ADCC y/o la CDC contra tales células y/o pueden inducir directamente la apoptosis o inhibir la proliferación de las células que portan en su superficie el antígeno asociado a tumor. Preferentemente, en este aspecto de la presente invención, la respuesta inmunitaria, preferentemente, la respuesta inmunitaria humoral, resulta en la reducción, preferentemente, en la inhibición del crecimiento tumoral, y con la máxima preferencia en la regresión del tumor en el sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la ruptura de la tolerancia a lo propio hacia un antígeno asociado a tumor en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención. Preferentemente, la ruptura de la tolerancia a lo propio es con respecto al antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo que está comprendido por la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar y/o prevenir un tumor en un sujeto, dicho método comprende administrar a dicho sujeto la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención. Preferentemente, dicho tumor se asocia con la expresión o la expresión anormal del antígeno asociado a tumor del que se deriva el epítipo que está comprendido en la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención. Los tipos de tumores preferidos particulares tratados y/o prevenidos son como se describen en la presente descripción, en particular, como se describe para los antígenos asociados a tumor representativos CLDN6, CLDN18.2 y PLAC1.

En modalidades preferidas de los métodos y usos de la presente invención, la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar al virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención se administran sin adyuvante.

La presente invención proporciona, además, el uso de la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un tumor, para producir una respuesta inmunitaria humoral contra un antígeno asociado a tumor en un sujeto, en donde el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en dicho sujeto, o para la ruptura de la tolerancia a lo propio hacia un antígeno asociado a tumor en un sujeto. En este contexto, las modalidades descritas anteriormente se aplican, además, a este aspecto de la presente invención.

Para todos los métodos y usos anteriores, la proteína de la presente invención, el ácido nucleico de la presente invención, el vector de la presente invención, la célula huésped de la presente invención, la partícula similar a virus de la presente invención, o la composición inmunogénica de la presente invención se administran, preferentemente, a un sujeto que lo necesita en una cantidad con eficacia terapéutica. Se prefiere que los compuestos y composiciones descritos en la presente descripción se administren por vía oral, bucal, sublingual, intranasal, a través de vías pulmonares tales como por inhalación, a través de rutas rectales, o parenteralmente, por ejemplo, intracavernosamente, intravenosamente, intraarterialmente, intraperitonealmente, intratecalmente, intraventricularmente, intrauretralmente, intraesternalmente, intracranalmente, intramuscularmente, intradérmicamente, intranodalmente o subcutáneamente. La administración puede ser por infusión o por técnicas de inyección sin aguja. Preferentemente, los compuestos o composiciones descritos en la presente descripción se administran por vía parenteral. Una composición adecuada para la administración parenteral se usa mejor en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la solución sea isotónica con respecto a la sangre. Las soluciones acuosas deben tamponarse adecuadamente (preferentemente a un pH de 3 a 9), si es necesario.

Todos los métodos y usos de la presente invención se dirigen, preferentemente, al tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad tumorigénica como se describe en la presente descripción anteriormente. En algunas modalidades,

dichos métodos y usos de la presente invención pueden combinarse con la terapia tumoral convencional, tal como cirugía, radioterapia, quimioterapia y/o inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, los compuestos, composiciones, métodos, o usos de la presente invención pueden aplicarse después de la eliminación quirúrgica del tumor primario para dirigirse a las células tumorales que no se extirparon y/o evitar la formación de metástasis. Los compuestos y composiciones descritos en la presente descripción pueden ser, además, parte de una composición usada para quimioterapia, por ejemplo, pueden estar comprendidos por una composición quimioterapéutica convencional.

Los presentes inventores han logrado proporcionar medios para la inmunización activa de un sujeto contra enfermedades tumorigénicas que se asocian con la expresión o la expresión anormal de antígenos asociados a tumor, que son proteínas propias en dicho sujeto, y por lo tanto, proporcionan medios y métodos para prevenir y/o tratar tales enfermedades tumorigénicas.

La presente invención se describe en detalle mediante las figuras y los ejemplos más abajo, que se usan solamente para propósitos ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Debido a la descripción y los ejemplos, las modalidades adicionales que se incluyen del mismo modo en la invención son asequibles para el trabajador experto.

EJEMPLOS

Generación de las vacunas basadas en VLP de HBcAg

Para la generación recombinante de proteínas de fusión de HBcAg quiméricas, se generaron diversos vectores de expresión bacterianos (cadenas principales de HBcAg), que difieren con respecto a los sitios de inserción del epítipo dentro de la secuencia de HBcAg. En cualquiera de las cadenas principales de HBcAg generados, los epítipos pueden insertarse en regiones específicas de la MIR de HBcAg. Con la excepción de las cadenas principales de HBcAg, HBcAg Del 79-80 enlazador y HBcAg Del 79-80, los epítipos pueden unirse adicionalmente al extremo amino terminal o insertarse en la parte amino terminal de la proteína HBcAg, por ejemplo, entre los sitios de restricción Sall y SpeI (Fig. 1). La secuencia de tipo silvestre de la parte N-terminal del subtipo awy del gen HBc es MDIDPYK. La inserción de los sitios de restricción Sall y SpeI conduce a la secuencia M VDAATS DIDPYK, en donde las alaninas son necesarias para la separación de los sitios de restricción. La inserción de un epítipo (xxx) entre los sitios de restricción Sall y SpeI resultaría en la secuencia M VE xxx SS DIDPYK. Las secuencias de ADN de las proteínas de fusión se optimizaron por secuencia para la expresión en *E. coli*. Las secuencias de reconocimiento apropiadas para enzimas de restricción se integraron en los casetes de expresión para la proteína de fusión, que permiten reemplazar o integrar las diversas regiones del casete o el epítipo para insertarse sin mayor esfuerzo (ver Figs. 1 y 7).

Los epítipos CLDN6, CLDN18.2, y PLAC1 respectivamente se insertaron, bien sea, directamente en la MIR de HBcAg (cadena principal HBcAg, HBcAg Del 79-80), o se flanquearon en las regiones amino y carboxilo terminal por un enlazador glicina/serina (G₄SG₄) para aumentar la flexibilidad del epítipo durante el plegamiento de la proteína. Además, se integró una secuencia que codifica una etiqueta de histidina (etiqueta-His) en el extremo 3' del casete de expresión que permite una purificación posterior de la proteína de fusión en condiciones GMP mediante el uso de la cromatografía de afinidad (ver Fig. 1). Las secuencias de HBcAg utilizadas son variantes truncadas en 3' que codifican una proteína HBcAg truncada en el C-terminal (aa 1-150). Esta variante es capaz de ensamblarse en VLP y no es capaz de unirse a los ácidos nucleicos en contraste con el HBcAg de tipo silvestre (aa 1-183), lo que evita una posible contaminación de la vacuna con ácidos nucleicos bacterianos.

Después de la expresión de los constructos de fusión de HBcAg quiméricos en *E. coli* las proteínas de fusión se purifican en su forma dimerica en condiciones de desnaturalización mediante el uso de cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados. Posteriormente, el ensamblaje *in vitro* de las proteínas de fusión en VLP se realiza mediante el uso de la diálisis contra un tampón altamente salino y una etapa final de ultracentrifugación con gradiente de densidad de sacarosa para la purificación y concentración posterior de las VLP ensambladas. El reensamblaje exitoso y la calidad de las VLP se comprobaron mediante el uso de la electroforesis en gel de agarosa de la proteína natural y la microscopía electrónica de transmisión de contraste negativo (ver Fig. 2). Se verificó que los epítipos específicos de los antígenos tumorales CLDN6, CLDN18.2, y PLAC1 pueden insertarse en HBcAg sin interferir con la capacidad de ensamblaje de HBcAg en VLP. Las proteínas de fusión que se purificaron mediante el uso de los métodos de desnaturalización se ensamblaron *in vitro* en VLP de alta pureza, que no difieren en su aspecto de microscopía electrónica de las VLP de HBcAg de tipo silvestre. Los resultados de los experimentos adicionales de inmunización se muestran a continuación de manera ilustrativa para las siguientes VLP de HBcAg quiméricas (ver Fig. 8):

HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto (secs. con núms. de ident.: 37 y 41): Proteína de fusión que consiste en un dominio amino y carboxilo terminal de HBcAg (vector de expresión HBcAg Del 79-80), un epítipo CLDN18.2, insertado y flanqueado por enlazador de glicina (TQDLYNNPVT; sec. con núm. de ident.: 21), del dominio extracelular 1 (EC1) y una etiqueta de His en el C-terminal.

HBcAg Del 79-80 CLDN18.2-EC1 corto (secs. con núms. de ident.: 38 y 42): Proteína de fusión que consiste en un dominio amino y carboxilo terminal de HBcAg (vector de expresión HBcAg Del 79-80), un epítipo CLDN18.2 insertado (TQDLYNNPVT; sec. con núm. de ident.: 21), del dominio extracelular 1 (EC1) y una etiqueta de His en el C-terminal.

HBcAg Del 79-80 enlazador PLAC1 3^{er} Lazo A (secs. con núms. de ident.: 39 y 43): Proteína de fusión que consiste en un dominio amino y carboxilo terminal de HBcAg (vector de expresión HBcAg Del 79-80), un epítipo PLAC1, insertado y flanqueado por enlazador de glicina (VFSEEEHTQVP; sec. con núm. de ident.: 22), del tercer lazo previsto de la proteína PLAC1 y una etiqueta de His en el C-terminal.

5 HBcAg Del 79-80 PLAC1 3^{er} Lazo B (secs. con núms. de ident.: 40 y 44): Proteína de fusión que consiste en un dominio amino y carboxilo terminal de HBcAg (vector de expresión HBcAg Del 79-80), un epítipo PLAC1, insertado (VFSEEEHTQV; sec. con núm. de ident.: 23), del tercer lazo previsto de la proteína PLAC1 y una etiqueta de His en el C-terminal.

10 Comprobación de las vacunas basadas en VLP de HBcAg quiméricas

15 Para la comprobación de las diversas especies generales que abarcan inmunogenicidad y antigenicidad de las VLP de HBcAg quiméricas purificadas, estas se aplicaron a conejos NZW y ratones Balb/c (solo las VLP que portan el epítipo CLDN18.2), respectivamente. Los estudios de inmunización se realizaron con y sin la adición de adyuvantes.

20 La secuencia del epítipo CLDN18.2 (sec. con núm. de ident.: 21) es idéntica a la región respectiva de la proteína expresada de manera endógena en conejo y ratón. La inducción de una respuesta de anticuerpos contra CLDN18.2, por lo tanto, indicaría la ruptura de la tolerancia a lo propio en el organismo respectivo. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IF) así como también los análisis de citometría de flujo (FACS) se usaron como lectura de salida para la caracterización y validación de las respuestas inmunitarias humorales inducidas.

25 Las células CHO transfectadas de manera transitoria con CLDN18.2 y PLAC1, respectivamente, se usaron para IF indirecta. Las células se fijaron en portaobjetos, se permeabilizaron en algunos casos (solo para CLDN18.2) y se incubaron posteriormente con los respectivos antisueros policlonales. La detección inmunológica de anticuerpos unidos se realizó mediante el uso de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia. Las células CHO no transfectadas o las células CHO transfectadas incubadas solo con los anticuerpos secundarios se usaron como controles negativos. Además, los antisueros policlonales dirigidos a CLDN18.2 se probaron con respecto a su especificidad mediante el uso de células CHO que se transfectaron con CLDN18.1, una variante de corte y empalme de CLDN18 que difiere de CLDN18.2 en los aminoácidos amino-terminales 1-69 (ver Fig. 3).

35 Se muestra que los antisueros policlonales generados fueron capaces de reconocer los respectivos antígenos diana de superficie en su conformación natural y que estos anticuerpos pueden unirse a dichos antígenos de superficie (mostrado ilustrativamente en la Fig. 3 para CLDN18.2 y PLAC1). Fue irrelevante que los inmunógenos se aplicaran con, o sin adyuvantes. Además, se demostró para el epítipo CLDN18.2 que portan las VLP de HBcAg, que estas son capaces de romper la tolerancia a lo propio en dos especies diferentes. Además, los antisueros que se generaron mediante inmunización con el epítipo CLDN18.2 exhibieron una reactividad inmunitaria específica de isoforma contra células transfectadas con CLDN18.2.

40 Se realizó el análisis por FACS como un enfoque adicional para comprobar la inmunorreactividad del antisuero policlonal generado (mostrado ilustrativamente para CLDN18.2; ver Fig. 4). Contrario a la IF indirecta, sin embargo, las células no se fijaron ni se permeabilizaron previamente en estos experimentos. Por lo tanto, la detección de los antígenos se realiza en su conformación natural en células vivas. Además, se usaron células que expresan de manera endógena el antígeno diana asociado a tumor, por lo que se comprobó si los antisueros generados son capaces de detectar densidades fisiológicas de los epítipos del antígeno asociado a tumor (ver Fig. 4).

45 Se demostró que los antisueros policlonales generados dirigidos a CLDN18.2 fueron capaces de detectar los antígenos expresados de manera endógena y de unirse específicamente a la proteína en su conformación natural en células vivas. Se comprobó que la tolerancia existente de las células B frente a la proteína propia puede romperse mediante vacunación activa, en donde la adición de adyuvantes al inmunógeno fue irrelevante.

50 Además del reconocimiento de la conformación natural del antígeno diana de superficie celular, la inducción de anticuerpos con funciones efectoras con eficacia terapéutica es de suma importancia para una estrategia de inmunización activa exitosa. Las funciones efectoras de los anticuerpos son, por un lado, efectos citotóxicos, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), así como también los efectos antiproliferativos mediados por anticuerpo. Los ensayos basados en luciferasa de CDC y ADCC, respectivamente, se usaron para el análisis de las funciones efectoras citotóxicas del antisuero policlonal dirigido a CLDN18.2. Se demostró que los antisueros generados en dos especies diferentes exhibieron funciones efectoras de CDC, así como también de ADCC, que fueron dirigidas específicamente contra la isoforma CLDN18.2. Los antisueros policlonales inducidos mediante la inmunización con VLP de HBcAg de tipo silvestre (sin epítipos de antígeno insertados) o los péptidos de CLDN18.2 conjugados a hemocianina de Keyhole Limpet (KLH) (que eran idénticos a los epítipos insertados en las VLP de HBcAg quiméricas) en combinación con adyuvantes no exhibieron ninguna función efectora citotóxica (ver Fig. 5).

60 Estudios previos han demostrado que la expresión de PLAC1 sustenta la proliferación. Por lo tanto, los antisueros policlonales dirigidos a PLAC1, que se generaron mediante inmunización activa, se analizaron con respecto a las funciones efectoras inhibitoras de la proliferación. Para este fin, las células que expresan PLAC1 de manera endógena (MCF-7) así como también las células negativas a PLAC1 (MelHO) se incubaron con antisueros policlonales dirigidos a

PLAC1 durante 72 horas y posteriormente se realizó un ensayo de proliferación basado en 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). Se usaron como controles un anticuerpo monoclonal dirigido contra el oncogén myc, y un antisuero policlonal contra CLDN18.2 que se generó mediante vacunación activa con VLP de HBcAg quimérica. Se demostró que solo los antisueros policlonales dirigidos a PLAC1 mediaban efectos antiproliferativos específicos de PLAC1, de manera dosis dependiente. Por lo tanto, junto con las funciones efectoras citotóxicas, pueden generarse, además, funciones efectoras de anticuerpos antiproliferativos a través de la inmunización activa mediante el uso de las VLP de HBcAg quimérica (ver Fig. 6).

Inmunización con VLP de HBcAg CLDN18.2-EC1 corto

La potencia de las VLP quiméricas para inducir respuestas de anticuerpos contra el epítipo de CLDN18.2 insertado se analizó mediante la inmunización de ratones y conejos. De manera importante, el epítipo seleccionado y la distribución tisular de las proteínas ortólogas con estricta restricción a las células gástricas de vida corta se conservan en las tres especies.

Se observó una respuesta inmunitaria humoral contra la diana casi máxima, evaluada mediante citometría de flujo, después de solo dos inmunizaciones, independientemente de la ruta de inmunización o de los adyuvantes aplicados. El análisis de la respuesta de anticuerpos específicos de la diana reveló que la reactividad del anticuerpo dirigido contra la diana disminuía con el tiempo y volvía a los niveles de fondo, aproximadamente, dos meses después de la tercera vacunación (vacunación en el d0, d10 y d28). Sin embargo, cuando se administró un refuerzo en el d102, la reactividad del autoanticuerpo contra la diana aumentó rápidamente, lo que sugiere la existencia de memoria inmunitaria para la producción de autoanticuerpos. Además, estos datos indican que es factible la inducción de autoanticuerpos diana específicos mediante las inmunizaciones de refuerzo y que la inmunidad dirigida contra HBcAg no fue dominante.

En un experimento adicional, relacionado en parte con la cuestión del contexto de la respuesta de anticuerpos, pudiera demostrarse que una respuesta inmunitaria preexistente contra la molécula portadora de HBcAg no anula la capacidad de las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto para inducir respuestas de autoanticuerpos diana específicos. Por lo tanto, puede superarse la supresión epitópica inducida por el vehículo potencialmente existente (CIES), lo que indica que la inmunogenicidad del epítipo CLDN18.2 expuesto a alta densidad sobre la superficie del vehículo de HBcAg (240 epítopos CLDN18.2 por molécula de VLP) es, en este contexto, comparable a la propia cadena principal.

Los ratones BALB/c se inmunizaron con VLP de HBcAg Del 79-80 CLDN18.2-EC1 corto, HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto o con el péptido lineal³²⁻⁴¹ de CLDN18.2 conjugado a KLH como control y se determinó la reactividad de los anticuerpos contra el péptido lineal³²⁻⁴¹ de CLDN18.2 o la cadena principal de HBcAg mediante las mediciones de los títulos por ELISA como criterio de valoración principal. Se aplicaron diferentes protocolos de inmunización, en donde se varió el adyuvante, la vía de administración, y la cantidad del inmunógeno, cada uno en grupos de 3-5 ratones.

Se observó que los sueros de ratones inmunizados con las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto exhibía una mayor reactividad específica contra el péptido lineal³²⁻⁴¹ de CLDN18.2 conjugado a BSA en comparación con los ratones en otros grupos. De manera interesante, los ratones inmunizados por vía s.c. con las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto sin la adición de adyuvantes revelaron los títulos promedios más altos, como criterio de valoración principal, contra el péptido. Todas las VLP indujeron anticuerpos contra la cadena principal de HBcAg con títulos similares, como criterio de valoración principal. La desnaturalización por calor de las VLP quiméricas anuló su capacidad de inducir anticuerpos de unión a péptidos sin comprometer el desarrollo de anticuerpos contra la cadena principal.

De los ratones vacunados con las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto ~90 % demostraron reconocer el epítipo CLDN18.2 lineal en ELISA. Un tercio de estos fueron capaces de unirse a la molécula natural CLDN18.2 en los transfectantes, como se analizó por FACS. En conejos, todos los sueros de los animales vacunados con las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto fueron capaces de reconocer el epítipo lineal así como también la proteína natural. Cuando se usaron los transfectantes de CLDN18.1 como control, no se observó reactividad cruzada con esta variante.

En comparación las VLP de HBcAg Del 79-80 CLDN18.2-EC1 corto, las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto fueron claramente superiores en la producción de autoanticuerpos, que reconocen la proteína natural en las densidades fisiológicas en la superficie de células tumorales que las producen de manera endógena.

La vacunación profiláctica con las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto confiere protección parcial en un modelo tumoral de ratón singénico inmunocompetente.

Para evaluar la eficacia profiláctica *in vivo* de las VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto, se usó un modelo tumoral singénico inmunocompetente en ratones BALB/c en los que se induce la formación de metástasis pulmonares mediante la aplicación por vía i.v. de las células de cáncer de colon CT26 transducidas de manera estable con CLDN18.2 murino.

Los ratones BALB/c se vacunaron tres veces (día 1, día 14, día 28) con 50 µg de las VLP de HBcAg truncada en el C-terminal (aminoácidos 1-150) VLP de HBcAg (HBcAgΔ), VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto, o PBS como control, todos formulados en AbISCO-100 (Isconova). Dos semanas después de la última inmunización, se administraron en la vena de la cola 1×10^5 células de cáncer de colon CT26 singénicas que expresan de manera estable el CLDN18.2 murino. Trece días más tarde se sacrificaron los ratones, se pesaron los pulmones y se sometieron a un análisis microscópico para evaluar la carga de metástasis pulmonares. El análisis estadístico de los pesos pulmonares se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Para la evaluación histopatológica, se desparafinaron y rehidrataron secciones de tres µm de grosor de pulmones fijados en formalina y embebidos en parafina, seguidos por la recuperación de epítomos inducida por calor en tampón de citrato a pH 6. Después de inactivar las peroxidasas endógenas mediante H₂O₂, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de anticuerpos con suero de cabra al 10 %, seguido de incubación durante la noche con el antisuero policlonal de conejo anti-CLDN18 (Mid) (Invitrogen) a 4 °C. Para la detección de la unión, se usaron un anticuerpo secundario conjugado con HRP (BrightVision Poly-HRP-Anti-conejo, Immunologic) y el kit Vector NovaRED™ (Vector Laboratories). Después de la tinción de contraste con hematoxilina, la deshidratación y el montaje, las secciones se documentaron mediante el uso de un MIRAX SCAN (Zeiss). Se determinaron las relaciones de las áreas tumorales y del tejido normal mediante el uso del programa ImageJ v.1.44. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba de Dunn.

El análisis macroscópico de los pulmones derivados de ratones vacunados con VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto reveló un número menor de nódulos metastásicos en comparación con los grupos inmunizados con VLP de HBcAgΔ o grupos de control con PBS (Fig. 9A) y pesos pulmonares inferiores significativamente menores, similares a los de ratones no expuestos a células tumorales (Fig. 9B). Además, el porcentaje de área de tejido canceroso por sección pulmonar completa calculada después de visualizar las metástasis pulmonares CT26-CLDN18.2 mediante tinción IHC para CLDN18.2 fue significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con los ratones vacunados con VLP de HBcAgΔ o grupos de control con PBS (Fig. 9C, 9D).

En conclusión, estos datos muestran que la vacunación profiláctica con VLP de HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto media la protección contra células CT26-CLDN18.2 altamente malignas/tumorígenicas.

En resumen, las VLP de HBcAg quiméricas desarrolladas cumplen todos los requisitos para usar en una vacunación activa antitumoral efectiva inmunoterapéuticamente. Se demostró que mediante la administración de las VLP de HBcAg quiméricas, pueden generarse anticuerpos en un sujeto contra antígenos asociados a tumor, que son proteínas propias en dicho sujeto, y que los antisueros inducidos median funciones efectoras terapéuticamente efectivas.

ES 2 675 825 T3

Listado de secuencias

5 <110> BioNTech AG y otros.
 <120> Vacunación tumoral que involucra una respuesta inmunitaria contra proteínas propias
 <130> 674-14 PCT
 <150> EP 10 002 775.4
 <151> 2010-03-16
 <150> EP 10 016 216.3
 10 <151> 2010-12-30
 <160> 80
 <170> PatentIn versión 3.4

 <210> 1
 15 <211> 183
 <212> PRT
 <213> virus de Hepatitis B

 <400> 1
 20 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

 25 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

 30 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

 35 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala
 65 70 75 80

 Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 85 90 95

 40 Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 100 105 110

 45 Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125

 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140

 50 Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
 145 150 155 160

 Pro Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
 165 170 175

 55 Lys Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 180

60 <210> 2

65

ES 2 675 825 T3

<211> 552
 <212> ADN
 <213>virus de Hepatitis B

5 <400> 2

atggacatcg acccttataa agaatttggg gctactgtgg agttactctc gtttttgcct 60
 tctgacttct ttccttcagt acgagatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa 120
 10 gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg cactcaggca agcaattctt 180
 tgctgggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg ttaatttggg agatccagcg 240
 tctagagacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gcctaaagt caggcaactc 300
 15 ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga gtatttgggtg 360
 tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaagtc ccctatccta 420
 tcaacacttc cggagactac tgttgttaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact 480
 20 ccctcacctc gcagacgaag gtctcaatcg cgcgctcgca gaagatctaa atctcgggaa 540
 tctcaatggt ag 552

25 <210> 3
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 3

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

65

ES 2 675 825 T3

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
 145 150 155 160
 5 Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
 165 170 175
 10 Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
 180 185 190
 15 Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
 195 200 205
 20 Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
 210 215 220

<210> 4
 <211> 663
 <212>ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atggcctctg ccggaatgca gatcctggga gtcgtcctga cactgctggg ctgggtgaat 60
 30 ggccctggtct cctgtgccct gcccatgtgg aaggtagaccg ctttcatcgg caacagcatc 120
 gtggtggccc aggtggtgtg ggagggcctg tggatgtcct gcgtggtgca gagcaccggc 180
 cagatgcagt gcaaggtgta cgactcactg ctggcgctgc cacaggacct gcaggctgca 240
 35 cgtgccctct gtgtcatcgc cctccttgtg gccctgttcg gcttgctggt ctaccttgc 300
 ggggccaagt gtaccacctg tgtggaggag aaggattcca aggcccgcct ggtgctcacc 360
 tctgggattg tctttgtcat ctacggggtc ctgacgctaa tccccgtgtg ctggacggcg 420
 40 catgccatca tccgggactt ctataacccc ctggtggctg aggcccaaaa gcgggagctg 480
 ggggcctccc tctacttggg ctgggcggcc tcaggccttt tgttgctggg tggggggtg 540
 ctgtgctgca cttgccctc gggggggtcc cagggccca gccattacat ggcccgtac 600
 45 tcaacatctg ccctgccat ctctcggggg ccctctgagt accctaccaa gaattacgtc 660
 tga 663

<210> 5
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
 1 5 10 15
 60 Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20 25 30
 65 Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35 40 45

ES 2 675 825 T3

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50 55 60
 5 Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65 70 75 80
 Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
 85 90 95
 10 Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
 100 105 110
 15 Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
 115 120 125
 Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130 135 140
 20 Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
 145 150 155 160
 25 Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 165 170 175
 Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180 185 190
 30 Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220
 35 Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240
 40 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255
 Lys His Asp Tyr Val
 260

45 <210> 6
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 6
 atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtggttt cactgattgg gattgcgggc 60
 55 atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtaaa caacccgta 120
 acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180

60

65

ES 2 675 825 T3

accgagtgcc ggggctactt caccctgctg gggctgccag ccatgctgca ggcagtgcga 240
 5 gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcctggatc catctttgcc 300
 ctgaaatgca tccgattgg cagcatggag gactctgcc aagccaacat gacactgacc 360
 tccgggatca tgttcattgt ctcaggtcct tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420
 10 aacatgctgg tgactaacct ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg 480
 atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca tttgggtcgg ctctgttcgt gggctgggtc 540
 gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tcgcctgccg gggcctggca 600
 15 ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct caggccacag tgttgccctac 660
 aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc tttgggtcca acaccaaaaa caagaagata 720
 tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatcct atccttccaa gcacgactat 780
 20 gtgtaa 786

<210> 7
 <211> 212
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

30 Met Lys Val Phe Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala
 1 5 10 15
 35 Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile
 20 25 30
 40 Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val
 35 40 45
 45 Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn
 50 55 60
 55 His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys
 65 70 75 80
 60 Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr
 85 90 95
 65 Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro
 100 105 110
 70 Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys
 115 120 125
 75 Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu
 130 135 140
 80 Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn
 145 150 155 160

65

ES 2 675 825 T3

Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val
 165 170 175
 5 Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser
 180 185 190
 His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met
 195 200 205
 10 Ile Gly Ser Met
 210
 <210> 8
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 20 atgaaagttt ttaagttcat aggactgatg atcctcctca cctctgcgtt ttcagccggt 60
 tcaggacaaa gtccaatgac tgtgctgtgc tccatagact ggttcatggt cacagtgcac 120
 cccttcatgc taaacaacga tgtgtgtgta cactttcatg aactacactt gggcctgggt 180
 25 tgcccccaa accatgttca gccacacgcc taccagttca cctaccgtgt tactgaatgt 240
 ggcattcaggg ccaaagctgt ctctcaggac atggttatct acagcactga gatacactac 300
 tcttctaagg gcacgccatc taagtttgtg atcccagtggt catgtgctgc cccccaaaag 360
 30 tccccatggc tcaccaagcc ctgctccatg agagtagcca gcaagagcag ggccacagcc 420
 cagaaggatg agaatgcta cgaggtgttc agcttgtcac agtccagtca aaggcccaac 480
 tgcgattgtc caccttgtgt ttccagtcaa gaagagcata cccaggtccc ttgtcaccaa 540
 35 gcaggggctc aggaggctca acctctgcag ccatctcact ttcttgatat ttctgaggat 600
 tggctctctc acacagatga tatgattggg tccatgtga 639
 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> epitopo CLDN6
 45 <400> 9
 Pro Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile
 1 5 10
 50 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> epitopo CLDN6
 <400> 10
 60 Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala
 1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 65 <213> Artificial

ES 2 675 825 T3

<220>
<223> epitopo CLDN6

<400> 11

5 Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitopo CLDN6

<400> 12

20 Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu Gly Leu Trp Met Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitopo CLDN6

<400> 13

30 Val Ala Gln Val Val Trp Glu Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln
1 5 10 15

35 Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
20

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitopo CLDN6

<400> 14

45 Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val
1 5 10 15

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitopo CLDN6

<400> 15

60 Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

65

ES 2 675 825 T3

<220>
<223> epítopo CLDN6

<400> 16

5 Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys
1 5 10

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epítopo CLDN6

<400> 17

20 Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln
1 5 10

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epítopo CLDN6

30 Thr Ala His Ala Ile Ile Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu
1 5 10

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epítopo CLDN6

<400> 19

45 Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys
1 5 10

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epítopo CLDN6

55 <400> 20

Ile Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu
1 5 10 15

60 <210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

65 <220>
<223> epítopo CLDN18.2

<400> 21
 Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr
 1 5 10
 5
 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> epítopo PLAC1
 <400> 22
 15 Val Phe Ser Gln Gln Gln His Thr Gln Val Pro
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> epítopo PLAC1
 25
 <400> 23
 Val Phe Ser Gln Gln Gln His Thr Gln Val
 1 5 10
 30
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> secuencia enlazadora
 <400> 24
 40 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 25
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 74-81" (Fig. 7A)
 <400> 25
 55
 60
 65

ES 2 675 825 T3

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

40 <210> 26
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 76-81" (Fig. 7B)

<400> 26
 Met Val Asp Ala Ala Thr Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly
 1 5 10 15
 50 Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser
 20 25 30
 55
 60
 65

ES 2 675 825 T3

Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu
 35 40 45
 5 Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala
 50 55 60
 Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val
 65 70 75 80
 10 Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Arg Asp Leu Val Val Ser
 85 90 95
 15 Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe
 100 105 110
 His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu
 115 120 125
 20 Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro
 130 135 140
 25 Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser His His His His His His
 165
 30 <210> 27
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 76-79" (Fig. 7C)
 40 <400> 27
 Met Val Asp Ala Ala Thr Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly
 1 5 10 15
 45 Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser
 20 25 30
 Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu
 35 40 45
 50 Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala
 50 55 60
 Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val
 65 70 75 80
 Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Arg Asp Leu Val
 85 90 95
 60
 65

ES 2 675 825 T3

Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu
 100 105 110

5 Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu
 115 120 125

10 Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 130 135 140

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
 145 150 155 160

15 Arg Gly Gly Ser His His His His His His
 165 170

<210> 28
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 79-80 enlazador" (Fig. 7D)

<400> 28

30 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

35 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

40 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

45 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val
 85 90 95

50 Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile
 100 105 110

Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser
 115 120 125

55 Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala
 130 135 140

60 Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Gly Gly Ser
 145 150 155 160

His His His His His His
 165

ES 2 675 825 T3

<210> 29
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg 77-enlazador-78" (Fig. 7E)

<400> 29

10

Met Val Asp Ala Ala Thr Ser Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly
 1 5 10 15

15

Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser
 20 25 30

20

Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu
 35 40 45

25

Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala
 50 55 60

Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val
 65 70 75 80

Asn Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Pro Ala Ser
 85 90 95

30

Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe
 100 105 110

35

Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu
 115 120 125

Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro
 130 135 140

40

Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu
 145 150 155 160

45

Thr Thr Val Val Arg Gly Gly Ser His His His His His
 165 170

<210> 30
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 79-80" (Fig. 7F)

55

<400> 30

60

65

ES 2 675 825 T3

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 5 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 10 35 40 45
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Ser Arg
 15 65 70 75 80
 Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg
 20 85 90 95
 Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr
 100 105 110
 Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro
 25 115 120 125
 Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr
 30 130 135 140
 Thr Val Val Arg Gly Gly Ser His His His His His His
 145 150 155

35
 <210> 31
 <211> 498
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 74-81" (Fig. 7A)
 45
 <400> 31

atggtcgacg cggcgactag tgatattgat ccgtataaag aatttggcgc gaccgtggaa 60
 ctgctgtcctt ttctgccgag cgattttttt ccgagcgtgc gtgatctgct ggataccgcg 120
 agcgcgctgt atcgtgaagc gctggaaagc ccggaacatt gcagcccgca tcataccgcg 180
 ctgcgtcagg cgattctgtg ctggggcgaa ctgatgaccc tggccacctg ggttggcggc 240
 ggtggaggat ccggtggcgg tggcagagat ctggtggtga gctatgtgaa caccaacatg 300
 ggccctgaaat ttcgccagct gctgtggttt catatcagct gcctgacctt tggccgtgaa 360
 accgtgattg aatatctggt gagctttggc gtgtggattc gtaccccgcc ggcatactgt 420
 ccgccgaacg cgccgattct gagcaccctg ccggaaacca ccgtcgtacg tggcggcagc 480
 catcatcatc atccatc 498

65

ES 2 675 825 T3

<210> 32
 <211> 504
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 76-81" (Fig. 7B)

<400> 32

10 atggtcgacg cggcgactag tgatattgat ccgtataaag aatttggcgc gaccgtggaa 60
 ctgctgtctt ttctgccgag cgattttttt ccgagcgtgc gtgatctgct ggataccgcg 120
 agcgcgctgt atcgtgaagc gctggaaagc ccggaacatt gcagcccgcg tcataccgcg 180
 15 ctgctgcagg cgattctgtg ctggggcgaa ctgatgaccc tggccacctg ggttggcgtg 240
 aacggcgggtg gaggatccgg tggcgggtggc agagatctgg tggtgagcta tgtgaacacc 300
 aacatgggcc tgaatttcg ccagctgctg tggtttcata tcagctgcct gacctttggc 360
 20 cgtgaaaccg tgattgaata tctggtgagc tttggcgtgt ggattcgtac cccgccggca 420
 tatcgtccgc cgaacgcgcc gattctgagc accctgccgg aaaccaccgt cgtacgtggc 480
 ggcagccatc atcatcatca ccat 504

25

<210> 33
 <211> 510
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 76-79" (Fig. 7C)

<400> 33

atggtcgacg cggcgactag tgatattgat ccgtataaag aatttggcgc gaccgtggaa 60
 ctgctgtctt ttctgccgag cgattttttt ccgagcgtgc gtgatctgct ggataccgcg 120
 40 agcgcgctgt atcgtgaagc gctggaaagc ccggaacatt gcagcccgcg tcataccgcg 180
 ctgctgcagg cgattctgtg ctggggcgaa ctgatgaccc tggccacctg ggtggcgtg 240
 aacggcgggtg gaggatccgg tggcgggtggc gcgtctagag atctggtggt gagctatgtg 300
 45 aacaccaaca tgggcctgaa atttcgccag ctgctgtggt ttcatatcag ctgcctgacc 360
 tttggccgtg aaaccgtgat tgaatatctg gtgagctttg gcgtgtggat tcgtaccccg 420
 ccggcatatc gtccgccgaa cgcgccgatt ctgagcacc tgcggaaac caccgtcgta 480
 50 cgtggcggca gccatcatca tcatcaccat 510

55

<210> 34
 <211> 498
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 79-80 enlazador" (Fig. 7D)

60

<400> 34

65

ES 2 675 825 T3

atggacattg atccgtataa agaatttggc gcgaccgttg aactgctgag ctttctgccg 60
 agcgatTTTT ttccgagcgt gcgatgatctg ctggataaccg cgagcgcgct gtatcgtgaa 120
 5 gcaactggaaa gcccggaaca ttgtagcccg catcataaccg cgctgctgca ggcgattctg 180
 tgttgggggtg aactgatgac cctggcgacc tgggttgggtg ttaatctcga ggatggtggc 240
 ggcgatccg gtggcgggtg ttctagagac ctggtggtga gctatgtgaa caccaacatg 300
 10 ggccTgaaat ttcccaact gctgtggtt catattagct gcctgacctt tggccgtgaa 360
 accgtgattg aatatctggt gagctttggc gtttgattc gtaccccgcc agcgtatcgt 420
 cgcggaacg cgccgattct gagcaccctg ccggaacca ccgttgttcg cggcggtagc 480
 15 catcatcatc atccat 498

<210> 35
 <211> 522
 <212>ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg 77-enlazador-78" (Fig. 7E)

<400> 35
 atggtcgacg cggcgactag tgatattgat ccgtataaag aatttggcgc gaccgtgaa 60
 ctgctgtctt ttctgccgag cgattttttt ccgagcgtgc gtgatctgct ggataaccg 120
 30 agcgcgctgt atcgtgaagc gctggaaagc ccggaacatt gcagcccga tcataaccg 180
 ctgctcagg cgattctgtg ctggggcgaa ctgatgacc tggccacctg ggtggcggtg 240
 aacctcgagg gcggtggagg atccggtggc ggtggcgatc cggcgtctag agatctggtg 300
 35 gtgagctatg tgaacaccaa catgggcctg aaatttcgcc agctgctgtg gtttcatatc 360
 agctgcctga ctttggccg tgaaccgtg attgaatc tgggtgagctt tggcgtgtgg 420
 attcgtacc cgcggcata tcgtccgccc aacgcgccga ttctgagcac cctgccgaa 480
 40 accaccgtc tacgtggcgg cagccatcat catcatcacc at 522

<210> 36
 <211> 471
 <212>ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena principal de HBcAg "HBcAg Del 79-80" (Fig. 7F)

<400> 36
 atggacattg atccgtataa agaatttggc gcgaccgttg aactgctgag ctttctgccg 60
 agcgatTTTT ttccgagcgt gcgatgatctg ctggataaccg cgagcgcgct gtatcgtgaa 120
 55 gcaactggaaa gcccggaaca ttgtagcccg catcataaccg cgctgctgca ggcgattctg 180
 tgttgggggtg aactgatgac cctggcgacc tgggttgggtg ttaatctcga ggactctaga 240
 gacctggtgg tgagctatgt gaacaccaac atgggcctga aatttcgcca actgctgtgg 300
 60 tttcatatta gctgcctgac ctttggccgt gaaaccgtga ttgaatatct ggtgagctt 360
 ggcgtttgga ttctacccc gccagcgtat cgtccgccga acgcgccgat tctgagcacc 420
 ctgccgaaa ccaccgttgt tcgcccgggt agccatcatc atcatcacca t 471

65

ES 2 675 825 T3

<210> 37
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Constructo de HBcAg quimérica "HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto" (Fig. 8A)
 <400> 37
 10 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 15 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 20 25 30
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 35 40 45
 20 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 25 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 25 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val
 85 90 95
 30 Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val Val
 100 105 110
 35 Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp
 115 120 125
 35 Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr
 130 135 140
 40 Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro
 145 150 155 160
 40 Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg
 165 170 175
 45 Gly Gly Ser His His His His His His
 180 185
 <210> 38
 <211> 167
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo de HBcAg quimérica "HBcAg Del 79-80 CLDN18.2-EC1 corto" (Fig. 8B)
 55 <400> 38
 60
 65

ES 2 675 825 T3

1 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 5 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 10 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 15 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Thr Gln
 20 Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr
 25 Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His
 30 Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val
 35 Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn
 40 Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Gly Gly
 45 Ser His His His His His His
 <210> 39
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo de HBcAg quimérica "HBcAg Del 79-80 enlazador PLAC1 3er Lazo A" (Fig. 8C)
 50 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 55 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 60 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 65

ES 2 675 825 T3

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 5 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln
 85 90 95
 10 Val Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val
 100 105 110
 Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu
 115 120 125
 15 Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu
 130 135 140
 20 Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 145 150 155 160
 Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
 165 170 175
 25 Arg Gly Gly Ser His His His His His His
 180 185
 30 <210> 40
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Constructo de HBcAg quimérica "HBcAg Del 79-80 PLAC1 3er Lazo B" (Fig. 8D)
 <400> 40
 40 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30
 45 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45
 50 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60
 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Val Phe
 65 70 75 80
 55 Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr
 85 90 95
 60
 65

ES 2 675 825 T3

Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His
 100 105 110

5 Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val
 115 120 125

10 Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn
 130 135 140

Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Gly Gly
 145 150 155 160

15 Ser His His His His His His
 165

20 <210> 41
 <211> 555
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Constructo de HBcAg quimérica "HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto" (Fig. 8A)

<400> 41

30 atggacattg atccgtataa agaatttggc gcgaccgttg aactgctgag ctttctgccg 60
 agcgattttt ttccgagcgt gcgtgatctg ctggataccg cgagcgcgct gtatcgtgaa 120
 gcactggaaa gcccggaaca ttgtagcccg catcataccg cgctgctgca ggcgattctg 180
 35 tgttgggggtg aactgatgac cctggcgacc tgggttgggtg ttaatctcga ggatggtggc 240
 ggcggatccg gcggaggcgg aaccaggat ctgtataaca atccggtgac cggcggaggc 300
 ggatccgggtg gcggtggttc tagagacctg gtggtgagct atgtgaacac caacatgggc 360
 ctgaaatttc gccaaactgct gtggtttcat attagctgcc tgaccttgg ccgtaaacc 420
 40 gtgattgaat atctggtgag ctttggcgtt tggattcgta ccccgccagc gtatcgtccg 480
 ccgaacgcgc cgattctgag caccctgccg gaaaccaccg ttgttcgagg cggtagccat 540
 catcatcatc accat 555

45 <210> 42
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Constructo de HBcAg quimérica "HBcAg Del 79-80 CLDN18.2-EC1 corto" (Fig. 8B)

<400> 42

55 atggacattg atccgtataa agaatttggc gcgaccgttg aactgctgag ctttctgccg 60
 agcgattttt ttccgagcgt gcgtgatctg ctggataccg cgagcgcgct gtatcgtgaa 120
 60 gcactggaaa gcccggaaca ttgtagcccg catcataccg cgctgctgca ggcgattctg 180

65

ES 2 675 825 T3

5 tgttggggtg aactgatgac cctggcgacc tgggttggtg ttaatctcga ggacaccag 240
 gatctgtata acaaccggg gacctctaga gacctggtg tgagctatgt gaacaccaac 300
 atgggcctga aatttcgcca actgctgtgg tttcatatta gctgcctgac ctttgccgt 360
 gaaaccgtga ttgaatatct ggtgagcttt ggcgtttgga ttcgtacccc gccagcgtat 420
 cgtccgccga acgcgccgat tctgagcacc ctgccggaaa ccaccgttgt tcgcggcggt 480
 10 agccatcatc atcatcacca t 501

<210> 43
 <211> 558
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo de HBcAg quimérica "HBcAg Del 79-80 enlazador PLAC1 3er Lazo A" (Fig. 8C)

20 <400> 43
 atggacattg atccgtataa agaatttggc gcgaccgttg aactgctgag ctttctgccg 60
 agcgattttt ttccgagcgt gcgtgatctg ctggataccg cgagcgcgct gtatcgtgaa 120
 25 gcaactggaaa gcccggaaca ttgtagcccg catcataccg cgctgcgtca ggcgattctg 180
 tgttggggtg aactgatgac cctggcgacc tgggttggtg ttaatctcga ggatggtggc 240
 ggcggatccg gcggaggcgg agttttctct gaagaagaac acaccaggt tccgggcgga 300
 30 ggcggatccg gtggcggtgg ttctagagac ctggtggtga gctatgtgaa caccaacatg 360
 ggcctgaaat ttcgccaact gctgtggttt catattagct gcctgacctt tggccgtgaa 420
 accgtgattg aatatctggt gagctttggc gtttgattc gtaccccgcc agcgtatcgt 480
 35 ccgccgaacg cgccgattct gagcaccctg ccggaacca ccgttgttcg cggcggtagc 540
 catcatcatc atcaccat 558

40 <210> 44
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Constructo de HBcAg quimérica "HBcAg Del 79-80 PLAC1 3er Lazo B" (Fig. 8D)

<400> 44
 atggacattg atccgtataa agaatttggc gcgaccgttg aactgctgag ctttctgccg 60
 50 agcgattttt ttccgagcgt gcgtgatctg ctggataccg cgagcgcgct gtatcgtgaa 120
 gcaactggaaa gcccggaaca ttgtagcccg catcataccg cgctgcgtca ggcgattctg 180
 tgttggggtg aactgatgac cctggcgacc tgggttggtg ttaatctcga ggacgttttc 240
 55 tctgaagaag aacacacca ggtttctaga gacctggtg tgagctatgt gaacaccaac 300
 atgggcctga aatttcgcca actgctgtgg tttcatatta gctgcctgac ctttgccgt 360
 gaaaccgtga ttgaatatct ggtgagcttt ggcgtttgga ttcgtacccc gccagcgtat 420
 60 cgtccgccga acgcgccgat tctgagcacc ctgccggaaa ccaccgttgt tcgcggcggt 480
 agccatcatc atcatcacca t 501

65

<210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> epítopo CLDN18.2

 10 <400> 45
 Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu
 1 5 10 15

15 <210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> epítopo CLDN18.2

 <400> 46

 25 Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln
 1 5 10

30 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> epítopo CLDN18.2

 <400> 47

 Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu
 1 5 10

40 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> epítopo CLDN18.2

 <400> 48

 50 Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe
 1 5

55 <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

 60 <220>
 <223> epítopo CLDN18.2

 <400> 49

 Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr
 1 5

65

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> epítopo CLDN18.2

10 <400> 50
Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu
1 5

15 <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> epítopo CLDN18.2

<400> 51

25 Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu
1 5

<210> 52
<211> 11
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epítopo CLDN18.2

35 <400> 52
Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu
1 5 10

40 <210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> epítopo CLDN18.2

<400> 53

50 Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser
1 5 10 15

<210> 54
<211> 20
55 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epítopo CLDN18.2

60 <400> 54

65

ES 2 675 825 T3

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val
1 5 10 15

5 Phe Asn Tyr Gln
20

<210> 55
<211> 23
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitopo CLDN18.2
15 <400> 55

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala
1 5 10 15

20 Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu
20

25 <210> 56
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> epitopo CLDN18.2
<400> 56

35 Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly
1 5 10 15

Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
20 25 30

40 <210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> epitopo CLDN18.2
<400> 57

50 Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr
1 5 10 15

55 Ser
<210> 58
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>
<223> epitopo CLDN18.2
<400> 58

65

ES 2 675 825 T3

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
1 5 10 15

5 Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe
20 25

<210> 59
<211> 11
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitopo PLAC1

15 <400> 59

Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro
1 5 10

20 <210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> epitopo PLAC1

<400> 60

30 Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro
1 5

35 <210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <223> epitopo PLAC1

<400> 61

Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr
45 1 5

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
50 <213> Artificial

<220>
<223> epitopo PLAC1

55 <400> 62

Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg
1 5

60 <210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

65

<220>
 <223> epítopo PLAC1

 <400> 63
 5 Ala Pro Gln Lys Ser Pro
 1 5

 <210> 64
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> epítopo PLAC1

 <400> 64

 20 Thr Ala Gln Lys Asp Glu Lys
 1 5

 <210> 65
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> epítopo PLAC1

 30 <400> 65

 Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys
 1 5

 35 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> epítopo PLAC1

 <400> 66

 45 Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys
 1 5 10

 <210> 67
 50 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> epítopo PLAC1

 55 <400> 67

 Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys
 1 5

 60 <210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

 65

ES 2 675 825 T3

<220>
<223> epitopo PLAC1

<400> 68
5 Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu
1 5 10 15

Lys
10

<210> 69
<211> 18
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> epitopo PLAC1
20 <400> 69

Pro Pro Asn His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val
1 5 10 15

Thr Glu
25

<210> 70
<211> 17
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitopo PLAC1
35 <400> 70

Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Lys Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp
1 5 10 15

Glu
40

<210> 71
<211> 16
45 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitopo PLAC1
50 <400> 71

Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Lys Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp
1 5 10 15

55
<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
60

<220>
<223> epitopo PLAC1

<400> 72
65

ES 2 675 825 T3

1 Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Lys Arg Ala Thr Ala Gln Lys
1 5 10 15

5 <210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> epítopo PLAC1

15 <400> 73
Arg Val Ala Ser Lys Ser Lys Arg Ala Thr Ala
1 5 10

20 <210> 74
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> epítopo PLAC1

<400> 74
Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn
1 5 10

30 <210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> epítopo PLAC1

40 <400> 75
Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg
1 5 10

45 <210> 76
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> epítopo PLAC1

<400> 76
Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp
1 5 10 15

val

60 <210> 77
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

65 <220>

ES 2 675 825 T3

<223> epítopo PLAC1

<400> 77

5 Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> epítopo PLAC1

<400> 78

Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn
1 5 10 15

20 <210> 79

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> HBcAg (delta); deleción C-terminal, que incluye un enlazador de glicina C-terminal y una etiqueta de His

<400> 79

30 Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

35 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

40 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80

45 Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

50 100 105 110

Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

55 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

60 Glu Thr Thr Val Val Arg Gly Gly Ser His His His His His His
145 150 155

65

ES 2 675 825 T3

<210> 80

<211> 477

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico optimizada por codones que codifica HBcAg(delta), truncamiento C-terminal que incluye un enlazador de glicina C-terminal y una etiqueta His

10

<400> 80

atggacattg atccgtataa agaatttggc gcgaccgttg aactgctgag ctttctgccc 60

agcgattttt ttccgagcgt gcgtgatctg ctggataccg cgagcgcgct gtatcgtgaa 120

15

gcaactggaaa gcccggaaca ttgtagcccg catcataccg cgctgctgca ggcgattctg 180

tggtgggggtg aactgatgac cctggcgacc tgggttggtg ttaatctcga ggaccggct 240

tctagagacc tgggtggtgag ctatgtgaac accaacatgg gcctgaaatt tcgccaactg 300

20

ctgtggtttc atattagctg cctgacctt ggccgtgaaa ccgtgattga atatctggtg 360

agctttggcg tttggattcg taccctgcca gcgtatcgtc cgccgaacgc gccgattctg 420

agcaccttgc cggaaaccac cgttgttcgc ggcggtagcc atcatcatca tcacat 477

Reivindicaciones

1. Una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 37.
- 5 2. Un ácido nucleico que codifica la proteína de la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 2.
- 10 4. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de la reivindicación 3.
5. Una partícula similar a virus que comprende múltiples copias de la proteína de la reivindicación 1.
- 15 6. Una composición inmunogénica que comprende la proteína de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2, el vector de la reivindicación 3, la célula huésped de la reivindicación 4, o la partícula similar a virus de la reivindicación 5 y un diluyente, vehículo, y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde la composición inmunogénica está, preferentemente, libre de adyuvantes.
- 20 7. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, un vector de acuerdo con la reivindicación 3, una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4, una partícula similar a virus de acuerdo con la reivindicación 5, o una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 6 para usar en (a) un método de tratamiento, profiláctico y/o terapéutico, de tumores caracterizados por la expresión de un antígeno asociado a tumor de acuerdo a la sec. con núm. de ident.: 5 o para usar en (b) un método para producir una respuesta inmunitaria humoral contra un antígeno asociado a tumor de acuerdo con la sec. con núm. de ident.:
25 5 en un sujeto, en donde el antígeno asociado a tumor es una proteína propia en dicho sujeto, y en donde dicho sujeto está afectado con un tumor o está en riesgo de desarrollar un tumor, dicho tumor se caracteriza por la relación del antígeno asociado a tumor con la superficie de una célula tumoral, en donde, preferentemente, no se administra adyuvante.

Figura 1

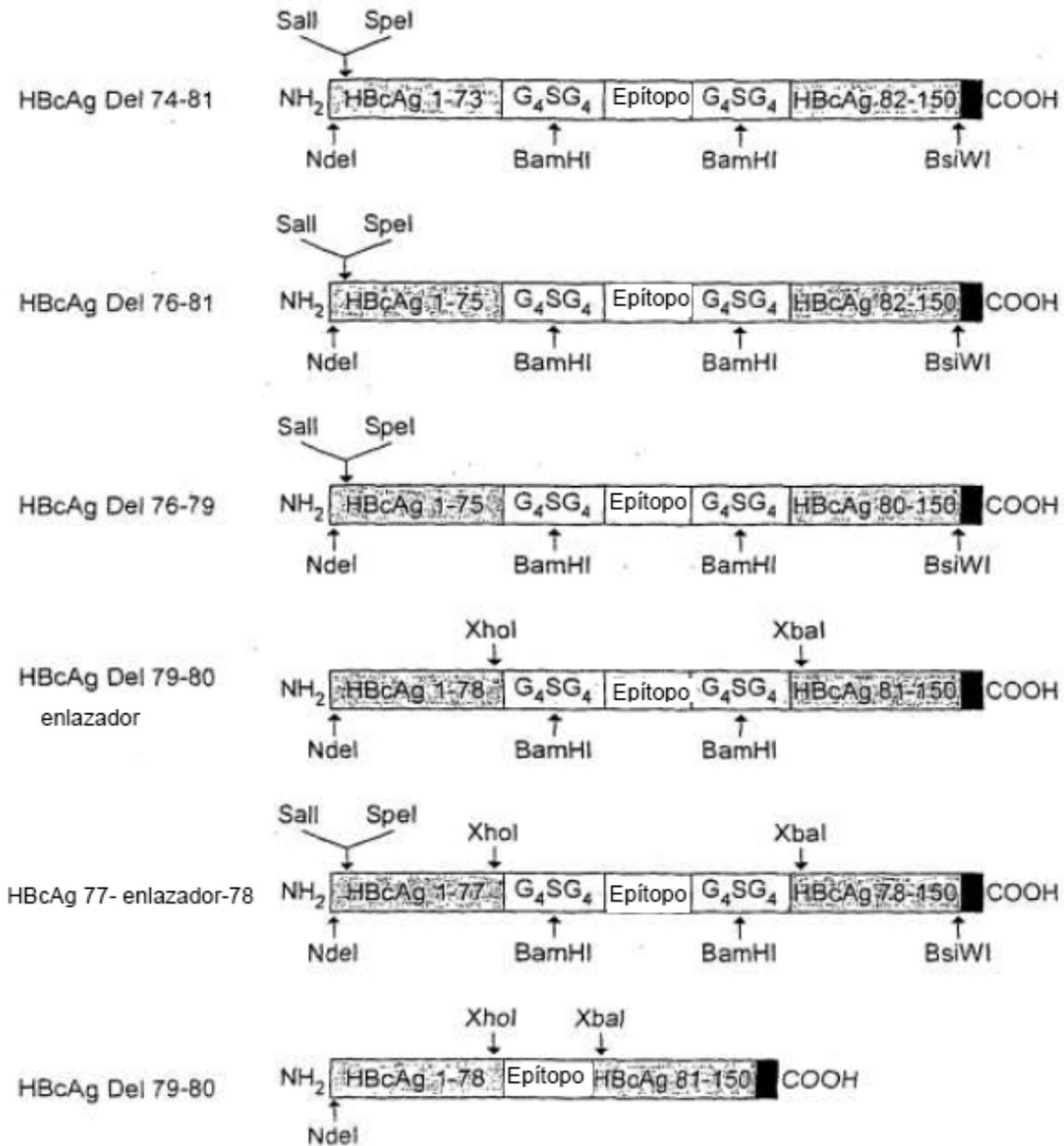


Figura 2

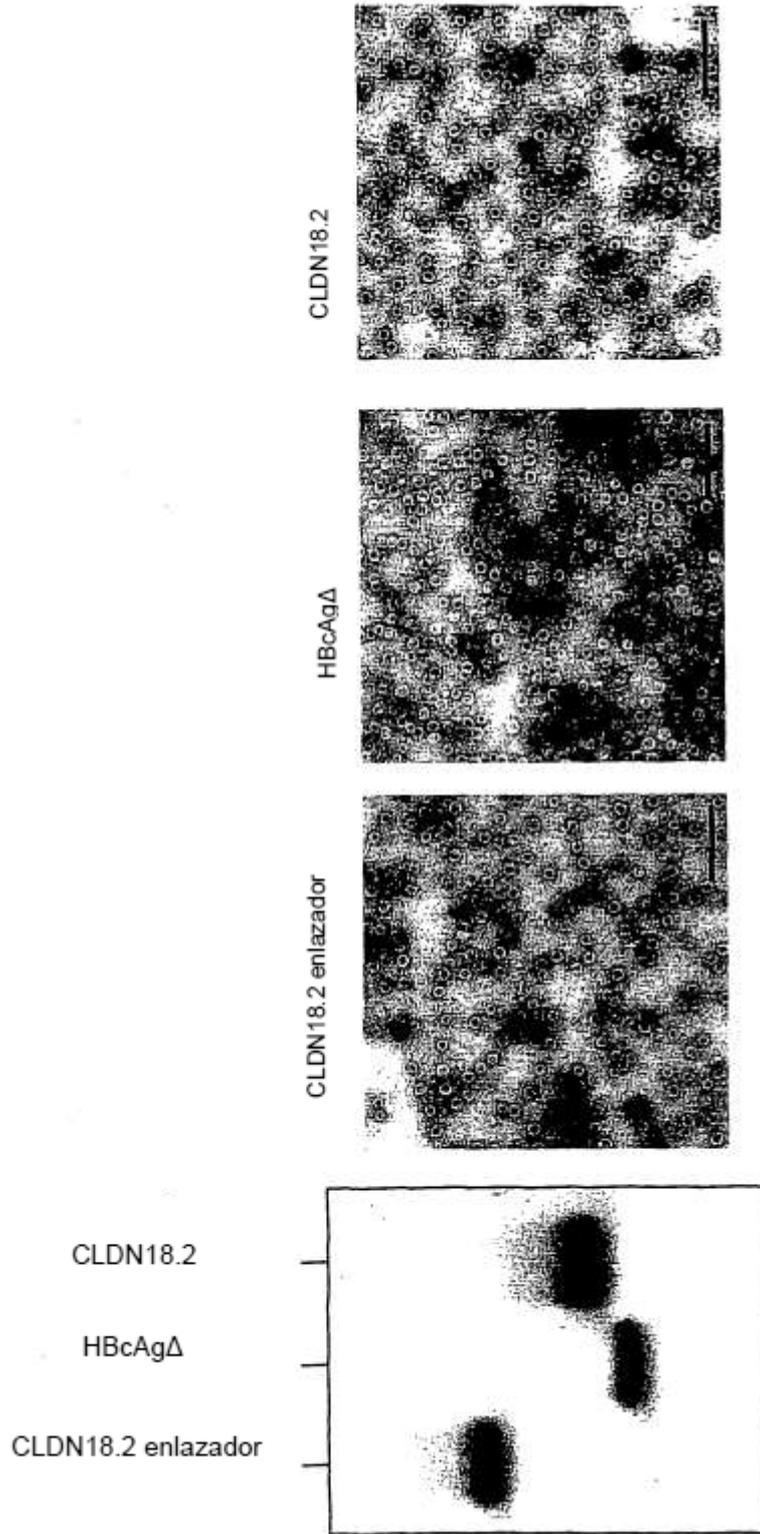
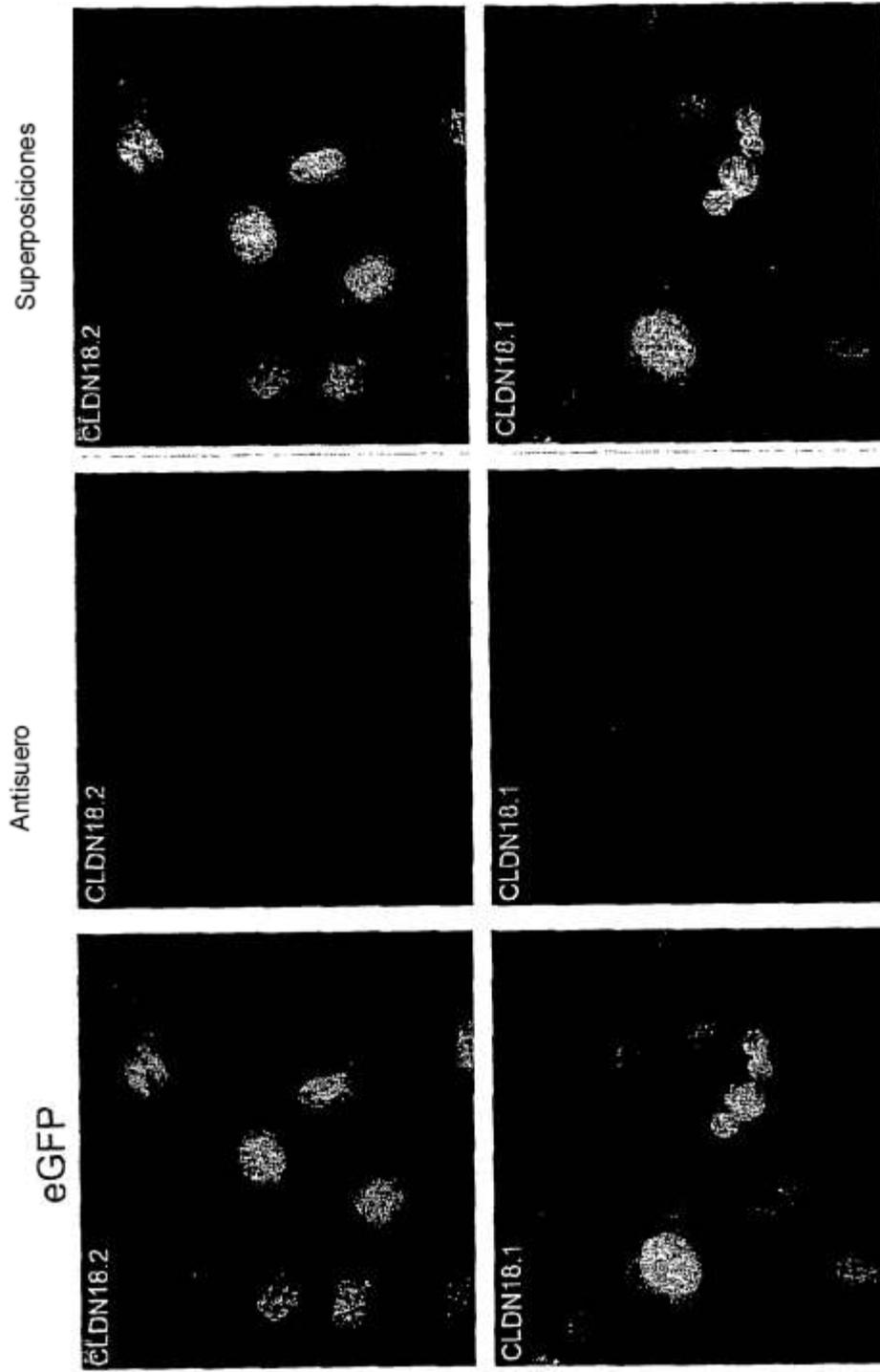


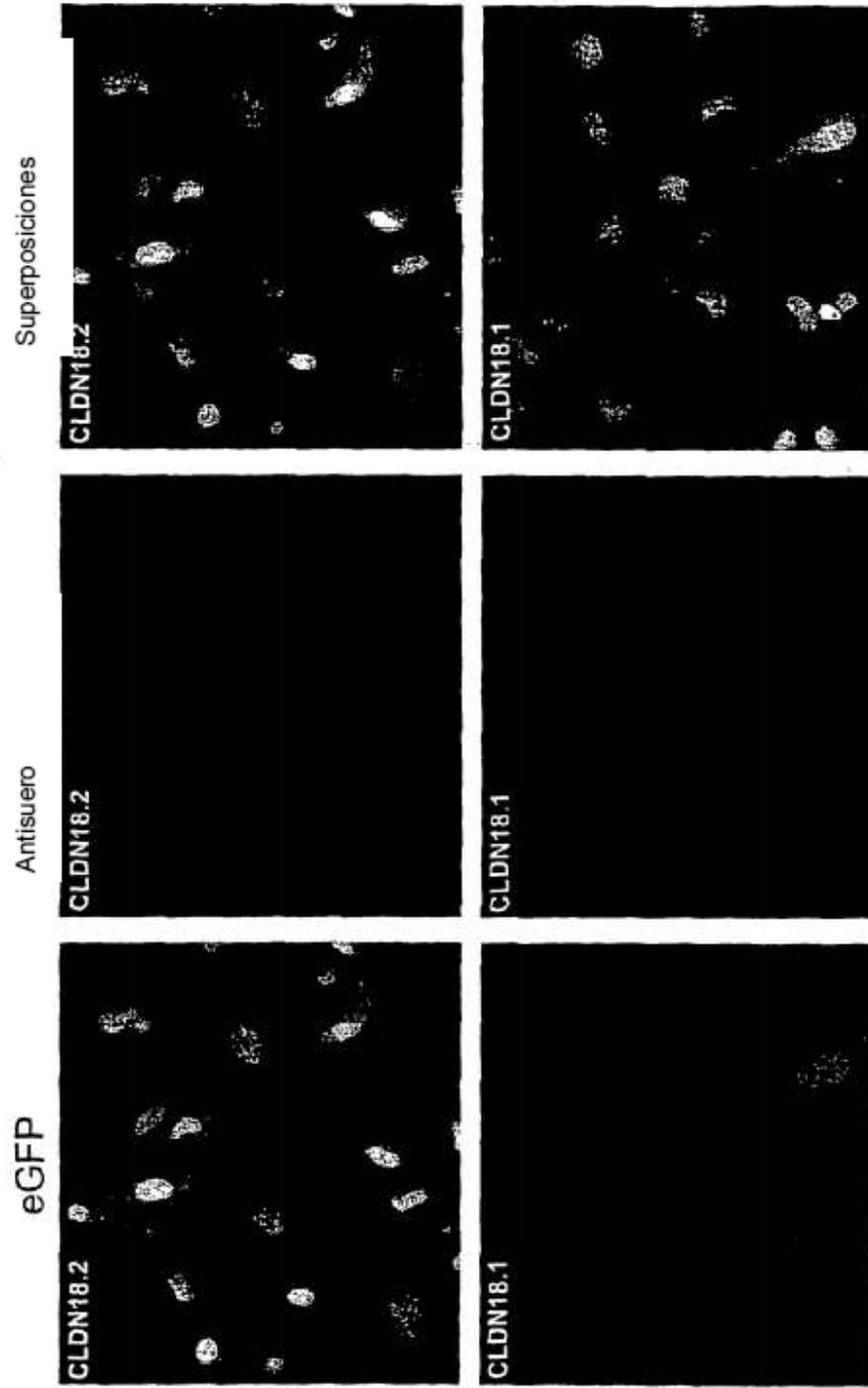
Figura 3A



Suero de conejo 5

Inmunógeno: HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto + adyuvante

Figura 3B



Suero de ratón 1/4

Inmunógeno: HBcAg Del 79-80 enlazador CLDN18.2-EC1 corto

Figura 3C

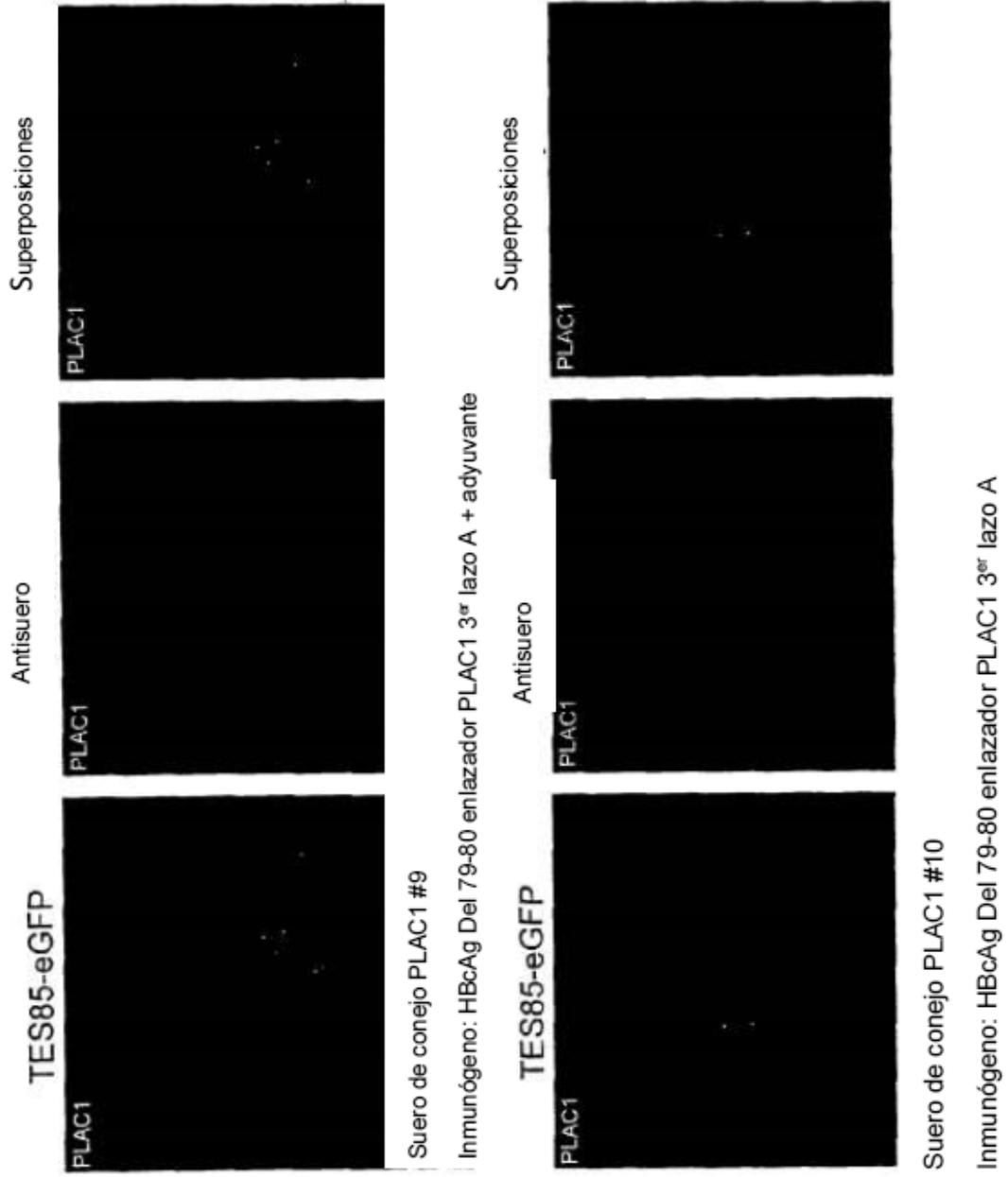


Figura 4

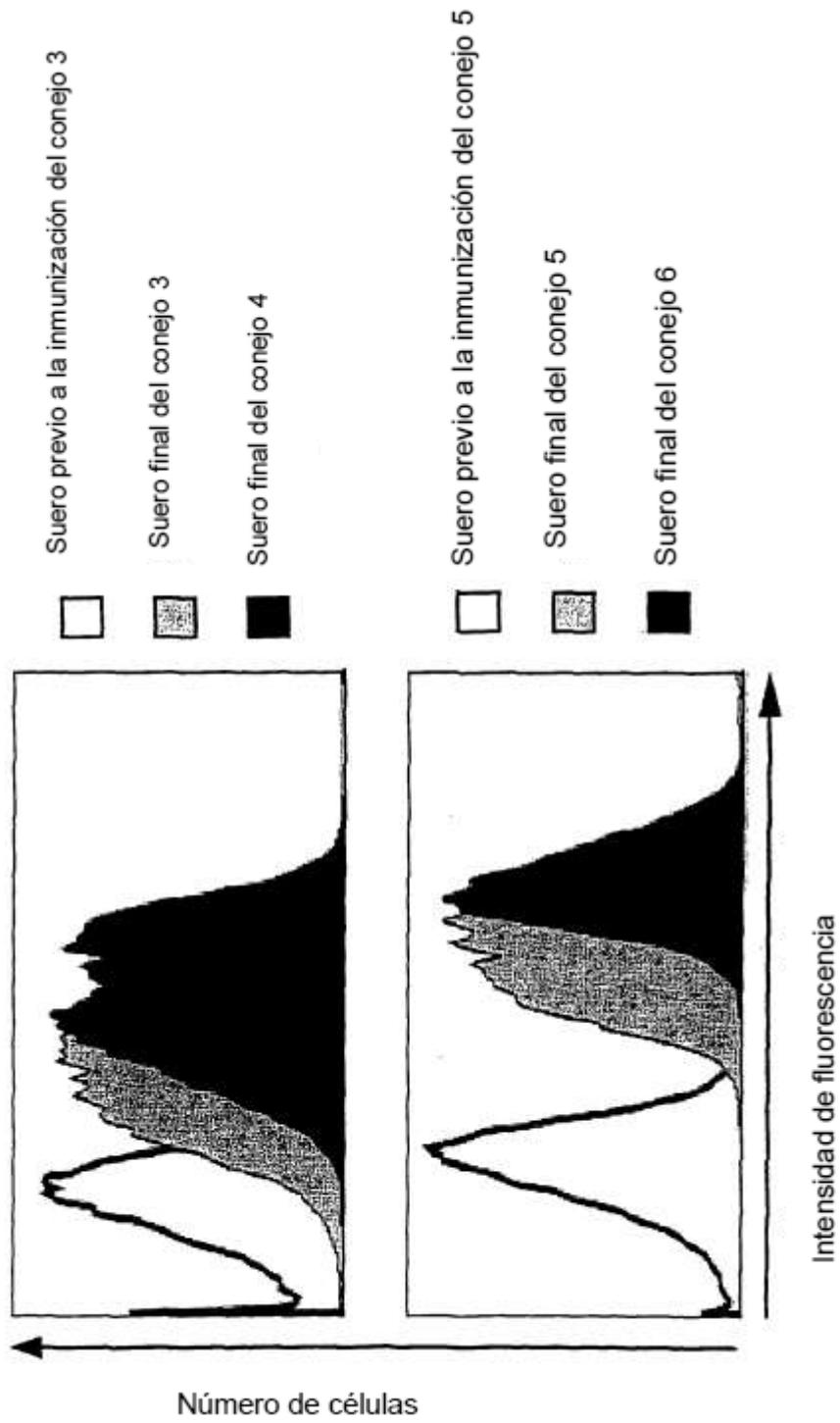


Figura 5A

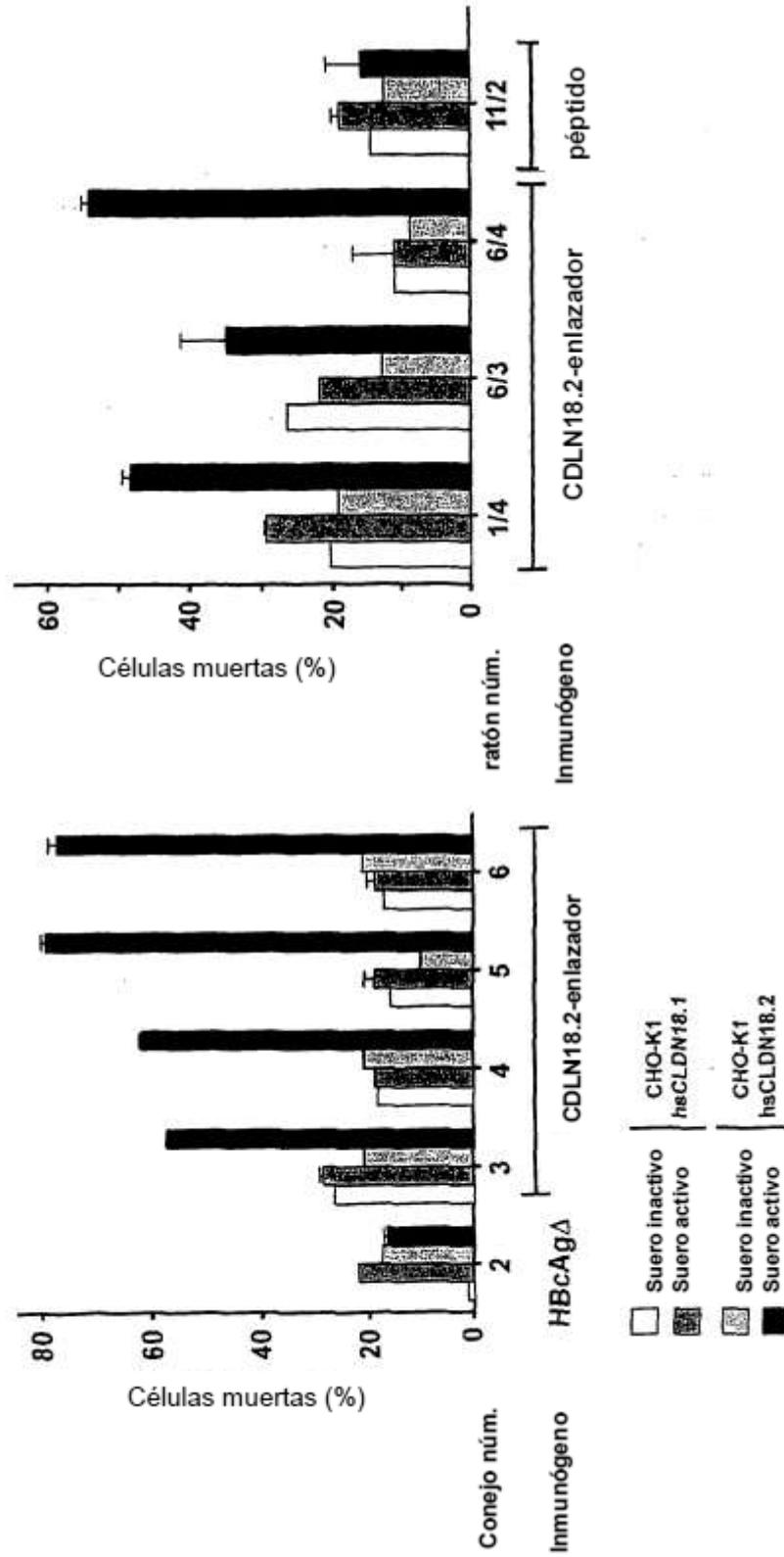


Figura 5B

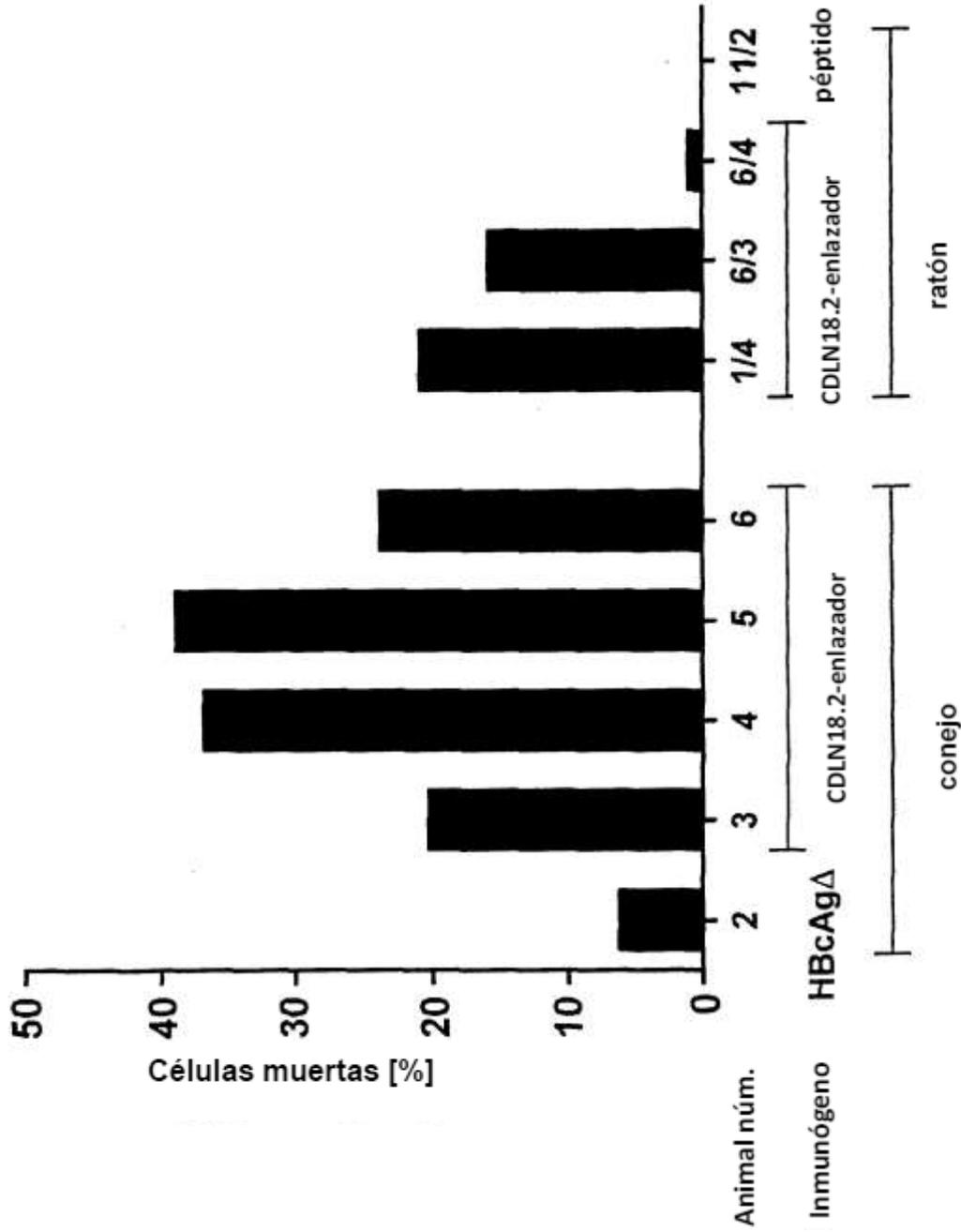


Figura 6A
 Inhibición de la proliferación de células MCF-7 (PLAC1 positivas)

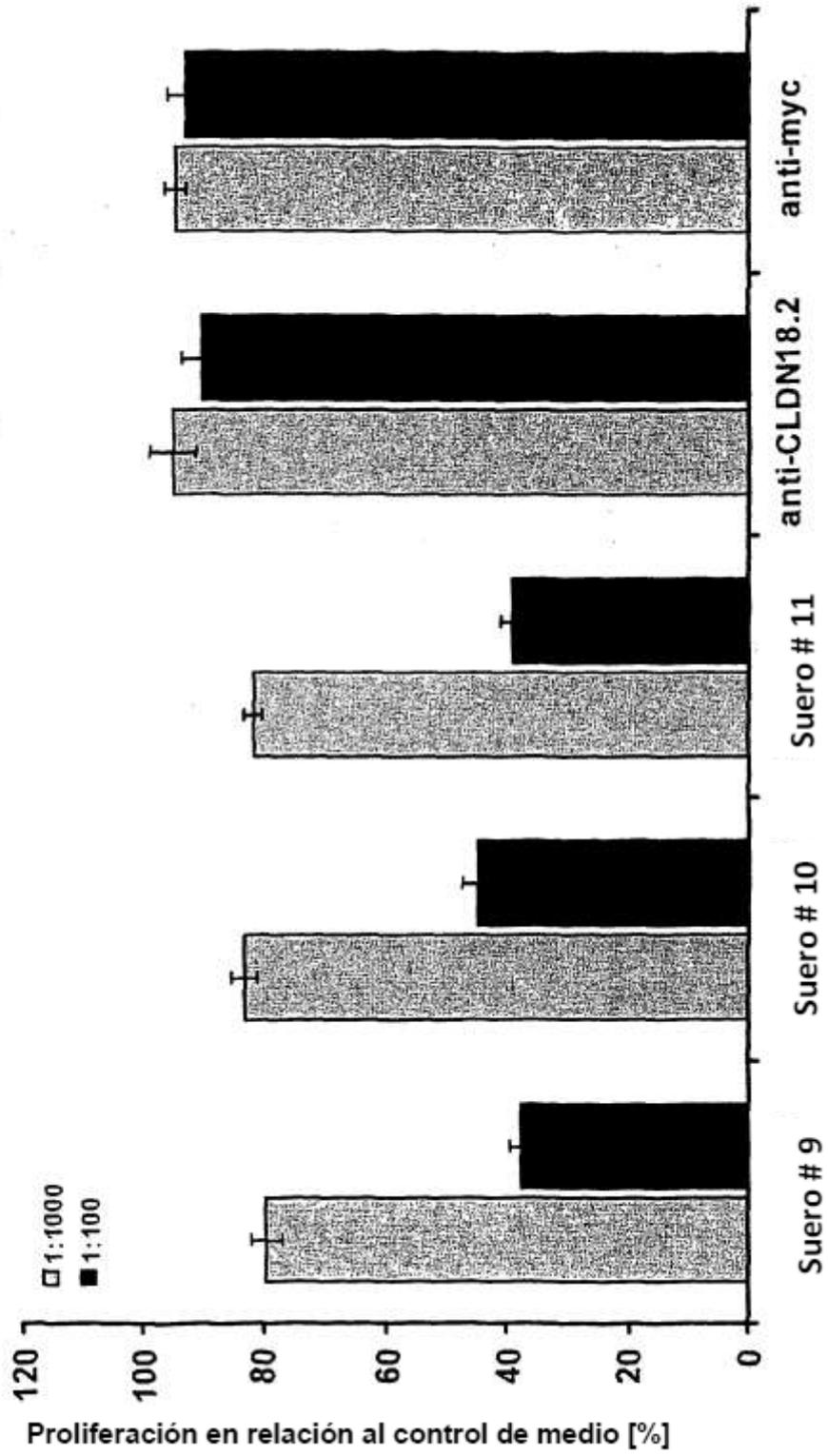


Figura 6B

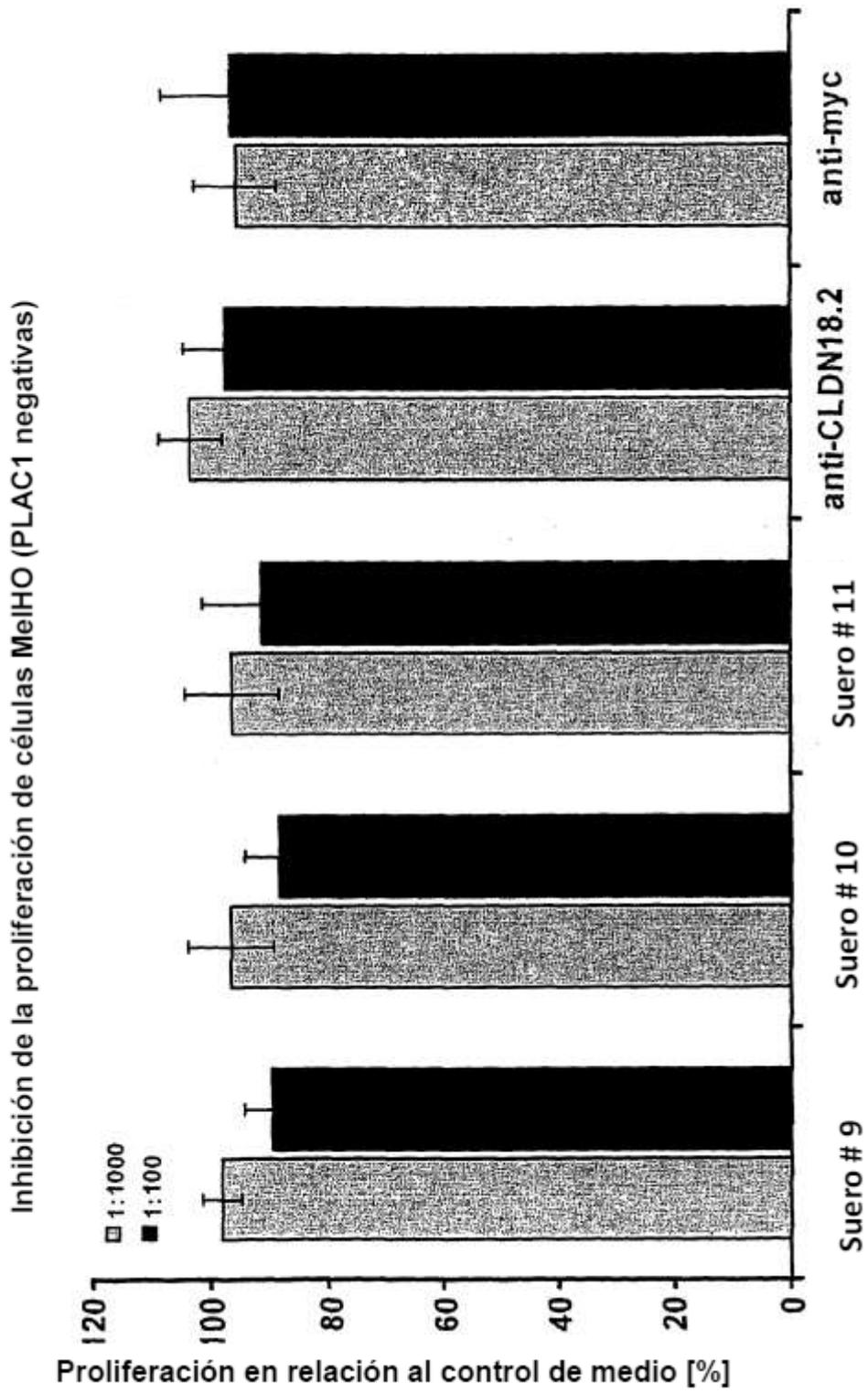


Figura 7A

```

>HBcAg Del 74-81
1  ATGGTCGACGGCGGACTAGTAGATATTGATCCGTATAAGAATTTGGCCGGACCGTGGA 60
1  M...D...A...A...S...D...P...Y...K...D...H...P...S...A...K...V...E... 20
61  CTGCTGTCTTTTCIGCCGAGCGGATTTTTTCCGAGCGTGCCTGATCTGCTGGATACCGCG 120
21  P...L...S...P...T...P...S...D...F...H...P...Z...S...V...R...D...F...L...D...L...A... 40
121  AGCGCGCTGTATCCGTGAAGCGCTGGAAAGCCCCGGAACATTGCA'GCCCGCATACCGCG 180
41  S...A...L...Y...R...P...A...L...P...S...P...H...L...G...S...L...U...H...L...A... 60
181  CTGCGTCAGGCGGATTCGTGCTGGGCGGAACCTGATGACCCCTGGCCACCTGGGTTGGCGGC 240
61  L...R...O...A...H...L...P...G...W...G...E...H...M...T...L...A...T...M...V...G... 80
241  GGTGGAGGATCCGGTGGCGGTGGCAGAGATCTGGTGGTGAGCTATGTGAACACCAACATG 300
81  G...G...S...G...G...G...R...P...L...Y...V...S...V...V...N...T...N...M... 100
301  GGCCTGAATTTCCGCCAGCTGCTGTGGTTTCAATATCAGCTGCCCTGACCTTTGGCCCGTGAA 360
101  G...H...K...H...R...O...T...L...M...T...H...E...S...C...H...T...G...R...E... 120
361  ACCGTGATTGAATAATCTGGTGAGCTTTGGCGGTGTGGATTCGTACCCCGCGGCATATCGT 420
121  T...V...L...L...V...P...V...S...F...G...V...M...R...S...L...P...A...T...V...R... 140
421  CCGCCGAACGGCCGGATTCGTAGCACCCCTGCCCGGAACCA'CCGTCGTACGTTGGCGGCAGC 480
141  E...P...N...A...P...E...L...S...T...G...G...L...L...N...L...V...V...S... 160
481  CATCATCATCATCACCATTAA 501
161  H...P...H...H...H...H... * 166
  
```


Figura 7C

```

>HBcAg Del 76-79
1  ATGGTCGACCGCGGACTAGTAGATATTGATCCGTATAAGAATTTGGCGCGACCGTGGAA 60
1  M V D A N I S D F S E A Y K A F L G A A V A E 20
61  CTGCTGCTTTTCTGCCGAGCGATTTTTTCCGAGCGTGGTGATCTGCTGGATACCGCG 120
21  L N S E D P S D F E P S V K D D L L L L A 40
121  AGCGGCTGATCGTGAAGCGCTGGAAGCCCGGAACATTCAGCCCGCATACCGCG 180
41  S A S L V L A E A E S P E H C S P D H I T A 60
181  CTGCGTCAGCGGATCTGTGCTGGGCGAACTGATGACCCCTGGCCACCTGGGTGGCGTG 240
61  L R Q A I L G W G D L M L E A I W V C V 80
241  AACGGCGGTGGAGGATCCGGTGGCGGTGGCGGCTAGAGATCTGGTGGTGAGCTATGTG 300
81  N G G G S G G G A S L D L V V S V M 100
301  AACACCAACATGGCCCTGAAATTCGCCAGCTGCTGGTTTCATAICAGCTGCCTGACC 360
101  N E N M G L L K T R O L L W H H S P C P E 120
361  TTTGGCCGTGAAACCGTGATTGAATATCTGGTGAGCTTTGGCGTGGATTTCGTACCCCG 420
121  E G R L P L T A E L E Y V S E F G V W L R P D E 140
421  CCGGCATATCGTCCGCGAACGCGCGATTCTGAGCACCCCTGCCGGAACCCACCGTCGTA 480
141  P A Y F D H N A P E L F S L L P E L T V V 160
481  CGTGGCGGCAATCATCATCACCATTAA 513
161  R G G S [REDACTED] * 170
    
```


Figura 7F

```

> HBcAg Del79-80
1  ATGGACATTGATCCGTATAAAGAATTGGCCGACCGCTTGAACCTGCTGAGCTTCTGCGG 60
1  M D T I L E V A T Y K E F E C A T V F L L L S P L T P 20
61  AGCGATTTTTTCCGAGCGGTGCGTGATCTGCTGGATACCGGAGCGCGTGTATCGTGAA 120
21  S D F A F P D S S V K D L L H D H L A S A M Y R K T 40
121  GCACTGGAAGCCCGGAACATTGTAGCCCGCATCATACCGCGCTGCGTCAAGCGGATTCTG 180
41  A D F S F E L E H C S P H H L A L R O A I L 60
181  TGTGGGGTGAACCTGATGACCCCTGGCCGACCTGGGTGGTGTAACTCGAGGACTCTAGA 240
61  C W G E L M T F A T M V G V N U F J S R 80
241  GACCTGGTGGTGAGCTATGTGAACACCAACATGGCCCTGAAATTCGCCCAACTGCTGTGG 300
81  D E V V S V V N I N M G E L K R R O L L G W 100
301  TTTCATATTAGCTGCCCTGACCTTTGGCCGTGAAACCGTGATTGAATATCTGGTGAGCTTT 360
101  F H I S C L T T F G R E T V F E V L V S L F 120
361  GCGGTTGGATTGTAACCCCGCAGCGTATCGTCGCCGGAACGGCCGATTCTGAGCACC 420
121  C Y M P R H P B A Y R P P N A P H L S G 140
421  CTGCCGGAACCCGTTGTTCCGGGGTAGCCATCATCATCACCATTAA 474
141  P P E T T V V R G G S P H H H H * 157

```


Figura 8D

> HBcAg Del 79-80 PLAC1 3^{er} Lazo B

```

1  ATGGACATTGATCCGTATAAAGAATTTGGGGCCGACCGTTGAACCTGCTGAGCTTTCGCCG 60
1  M...D...P...V...A...H...P...G...A...L...A...P...L...S...E...P...E...
61  AGCGATTTTTTCCGAGCGTGGGIGATCTGCTGGATACCGCGGAGCGCGCTGTATCGTGAA 120
21  S...D...P...H...P...S...V...R...P...L...I...D...L...A...S...A...P...R...E...
40
121  GCACTGGAAAGCCCGGAACATTTGTAGCCCGCATACCGCGCTGCGTCAAGCGGATTCGTG 180
41  A...L...E...S...P...E...H...G...S...P...H...H...I...A...T...R...O...A...I...
60
181  TGTGGGTGAACTGATGACCCCTGGCGACCTGGGTGGGTTAATCTCGAGGACGTTTTC 240
61  C...W...C...L...F...M...P...I...A...T...W...V...G...V...N...L...E...D...V...F...
80
241  TCTGAAGAAGAACACACCCAGGTTTCTAGAGACCTGGTGGIGAGCTATGTGAACACCAAC 300
81  S...E...E...H...T...Q...V...S...R...P...L...V...P...S...P...V...V...N...A...
100
301  ATGGCCCTGAATTTCCGCCAAGCTGCTGGTTTCATATTAGCTGCCTGACCTTTGGCCCGT 360
101  M...S...L...A...P...H...R...O...L...L...W...H...H...L...S...P...L...L...S...Y...
120
361  GAAACCGTGATTGAATATCTGGTGAGCTTTGGCGTTTGGATTCCGTAACCCCGCCAGCGTAT 420
121  E...H...M...I...P...A...T...V...S...H...G...V...W...R...P...L...P...P...A...
140
421  CGTCCGCCGAACCGGCCGATCTGAGCACCCCTGCCGGAACCCAGCTGTTCGCGGCGGT 480
141  R...P...E...N...A...E...H...H...S...T...I...P...E...H...T...V...G...V...S...
160
481  AGCCATCATCATCACCAATTA 504
161  S...H...E...E...N...T...E... * 167

```

Figura 9

