

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 213**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2014 PCT/US2014/061723**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15061416**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2014 E 14802730 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 3060232**

54 Título: **Epítomos agonistas de HLA-A24 de oncoproteína MUC1-C y composiciones y métodos de uso**

30 Prioridad:

23.10.2013 US 201361894482 P

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

10.12.2018

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer National Institutes
of Health 6011 Executive Boulevard, Suite 325
MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**SCHLOM, JEFFREY y
TSANG, KWONG-YOK**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 693 213 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

Epítomos agonistas de HLA-A24 de oncoproteína MUC1-C y composiciones y métodos de uso

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 61/894.482, presentada el 23 de octubre de 2013.

10 **Lista de secuencias**

Se incorpora como referencia en su totalidad en el presente documento un listado de secuencias de nucleótidos/de aminoácidos presentada de manera simultánea con el presente documento.

15 **Antecedentes de la invención**

MUC1 (CD227) es una glicoproteína de membrana de tipo I que se compone de heterodímeros de una subunidad grande N-terminal (MUC1-N) unida covalentemente a una subunidad pequeña C-terminal (MUC1-C).

20 La subunidad N-terminal (MUC1-N) es el dominio extracelular grande, que consiste en la región de número variable de repeticiones en tándem (VNTR) y la región sin VNTR. MUC1-N se excreta de las células y puede hallarse en la circulación de pacientes con cáncer avanzado. MUC1-N se usa como marcador tumoral (CA15.3) en pacientes con cáncer de mama (véase Hayes *et al.*, J. Clin. Oncol., 4: 1542-50 (1986)).

25 La región C-terminal de MUC1 (MUC1-C) tiene tres partes distintivas: un dominio extracelular pequeño que se une covalentemente a MUC1-N, un único dominio transmembrana, y una cola citoplasmática (véase Lan *et al.*, J. Biol. Chem., 265: 15294-9 (1990)). La cola citoplasmática contiene sitios para la interacción con proteínas de señalización, tales como β -catenina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y Src (véase Li *et al.*, J. Biol. Chem., 276: 35239-42 (2001)). Puesto que estas proteínas están situadas en la parte basolateral de las células sanas, se cree que las interacciones proteína-MUC1 no son importantes. Sin embargo, la pérdida de polaridad en células tumorales humanas permite que quede la cola citoplasmática expuesta a las proteínas de señalización, y puede producirse interacción (véase Vermeer *et al.*, Nature, 422: 322-6 (2003)).

35 Se ha mostrado que la región MUC1-C actúa como oncogén, conduciendo a la transformación de células humanas cuando MUC1-C se une a β -catenina (véase Li *et al.*, Oncogene, 22: 6107-10 (2003); Raina *et al.*, Cancer Res., 69: 5133-41 (2009); y Wei *et al.*, Cancer Res., 67: 1853-8 (2007)). Además, se ha demostrado que la transfección de MUC1-C es suficiente para inducir transformación y conferir actividades oncogénicas atribuidas previamente a la proteína MUC1 de longitud completa, tales como aumento de la tasa de crecimiento, crecimiento celular independiente de anclaje y resistencia a agentes quimioterápicos (véase Ren *et al.*, Cancer Cell. 5: 163-75 (2004)).

40 Además, la señalización de MUC1-C activada por c-Src está implicada en la perturbación tanto de las uniones adherentes de E-cadherina como las adhesiones focales de integrinas que estimulan la motilidad, invasión y metástasis de células cancerosas, lo que sugiere de ese modo un posible papel de MUC1-C en la transición epitelial a mesenquimatosa (EMT) (véase Hu *et al.*, Expert Rev. Anticancer Ther., 6: 1261-71 (2006)). También se ha hallado que la sobreexpresión de genes relacionados con MUC1 se asocia en gran medida con un mal pronóstico en

45 pacientes con cáncer de pulmón y de mama y con resistencia a fármacos (véanse Ren *et al.*, citado anteriormente; y Khodarev *et al.*, Cancer Res., 69: 2833-7 (2009)).

50 Numerosos ensayos clínicos han evaluado MUC1 como posible diana para la terapia con vacunas de una gama de tumores humanos. La mayoría de estos han empleado polipéptidos de la región VNTR. Se mostró que un epítipo agonista (P93L), en comparación con el epítipo nativo, potenciaba la generación de células T que también pueden lisar más eficazmente células tumorales humanas (véase Tsang *et al.*, Cancer Res., 10: 2139-49 (2004)). Se mostró que otros dos posibles epítomos agonistas en esta región potenciaban la producción de citocinas por células T, pero no se notificó destrucción de células tumorales (véase Mitchell *et al.*, Cancer Immunol. Immunother., 56: 287-301 (2007)).

55 Un método que se ha mostrado que potencia la capacidad de una vacuna para ser más eficaz es realizar alteraciones en la secuencia de aminoácidos de supuestos epítomos de células T, lo que puede potenciar a su vez la activación de células T y la destrucción por células T específicas de células tumorales (véanse Grey *et al.*, Cancer Surv., 22: 37-49 (1995); y Terasawa *et al.*, Clin. Cancer Res. 8: 41-53 (2002)). Sin embargo, no todas las sustituciones de un aminoácido de un posible epítipo de linfocito T citotóxico (CTL), conducirán a un epítipo agonista potenciador, y algunas sustituciones conducirán a epítomos antagonistas. Además, la generación de un supuesto epítipo agonista de un antígeno asociado a tumor también puede conducir a la potenciación de la activación de células T mediante la producción de IFN- γ , pero será inútil a menos que la célula T activada reconozca el epítipo endógeno (nativo) expresado en el contexto del CMH en la superficie de células tumorales humanas y,

65 por consiguiente, lise esas células tumorales.

Existe el deseo de identificar nuevos epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos y epítomos o péptidos agonistas potenciadores de MUC1-C, y de desarrollar composiciones y métodos que usan estos epítomos para el diagnóstico y/o tratamiento de cáncer.

5 Breve resumen de la invención

La invención proporciona un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

10 En otro aspecto, la invención proporciona a un ácido nucleico que codifica para el péptido, un vector que comprende el ácido nucleico, una célula que comprende el péptido, ácido nucleico o vector, y composiciones de los mismos.

En particular, la invención proporciona una proteína MUC1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 16,).

15 En otro aspecto, la invención proporciona una composición inmunoterápica de MUC1-levadura que comprende (a) un vehículo de levadura y (b) una proteína de fusión que comprende al menos un antígeno de MUC1, en la que el antígeno de MUC1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

20 La invención también proporciona una composición inmunoterápica de MUC1-levadura que comprende (a) un vehículo de levadura y (b) una proteína de fusión que comprende al menos un antígeno de MUC1, en la que el antígeno de MUC1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80% a (i) SEQ ID NO: 16, (ii) posiciones 92-566 de SEQ ID NO: 16, o (iii) una secuencia correspondiente de una proteína MUC1 diferente, y en la que el antígeno de MUC1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

25 La divulgación también proporciona una composición inmunoterápica de MUC1-levadura que comprende (a) un vehículo de levadura y (b) una proteína de fusión que comprende al menos un antígeno de MUC1, en la que el antígeno de MUC1 comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos de una proteína MUC1 de tipo natural en al menos una sustitución de aminoácido en una posición de secuencia, con respecto a una secuencia de aminoácidos de MUC1 de tipo natural tal como SEQ ID NO: 14, que se selecciona de:
30 T422, P430, T431, S462 y A470.

La invención también proporciona una composición inmunoterápica de MUC1-levadura para su uso en un método de potenciación de una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa MUC1 en un huésped que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el péptido, la proteína, el polinucleótido, ácido nucleico, vector, la célula o composición inmunoterápica de MUC1-levadura al huésped, en la que se potencia la respuesta inmunitaria en el huésped.
35

La invención también proporciona una composición inmunoterápica de MUC1-levadura para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que expresa MUC1 en un individuo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el péptido, ácido nucleico, vector, la célula o composición inmunoterápica de MUC1-levadura al individuo.
40

La invención también proporciona una composición inmunoterápica de MUC1-levadura para su uso en un método de reducción, detención, reversión o prevención de la progresión metastásica de cáncer en un individuo que tiene un cáncer que expresa MUC1 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el péptido, ácido nucleico, vector, la célula o composición inmunoterápica de MUC1-levadura al individuo.
45

La invención también proporciona una composición inmunoterápica de MUC1-levadura para su uso en un método de prevención o retraso de la aparición de un cáncer que expresa MUC1 en un individuo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el péptido, ácido nucleico, vector, la célula o composición inmunoterápica de MUC1-levadura al individuo.
50

La invención proporciona además un método de inhibición de un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto que comprende (a) estimular linfocitos obtenidos de un sujeto con una composición que comprende el péptido, ácido nucleico, vector o la célula al huésped para generar linfocitos T citotóxicos *ex vivo*, y (b) administrar los linfocitos T citotóxicos al sujeto, en el que se inhibe el cáncer que expresa MUC1 en el sujeto.
55

La invención proporciona un método de inhibición de un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto que comprende (a) tratar células dendríticas obtenidas de un sujeto con una composición que comprende el péptido, ácido nucleico, vector, la célula o composición inmunoterápica de MUC1-levadura *ex vivo*, y (b) administrar las células dendríticas tratadas al sujeto, en el que se inhibe el cáncer que expresa MUC1 en el sujeto.
60

Adicionalmente, la invención proporciona la inhibición de un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto que comprende (a) aislar células dendríticas de PBMC obtenidas de un sujeto, (b) tratar las células dendríticas con una composición que comprende el péptido, ácido nucleico, vector, la célula o composición inmunoterápica de MUC1-levadura *ex vivo*.
65

vivo, (c) activar las PBMC obtenidas del sujeto con las células dendríticas tratadas *ex vivo*, y (d) administrar las PBMC activadas al sujeto, en el que se inhibe el cáncer que expresa MUC1 en el sujeto.

La invención proporciona además la inhibición de un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto que comprende (a) aislar células dendríticas de PBMC obtenidas de un sujeto, (b) tratar las células dendríticas con una composición que comprende el péptido, ácido nucleico, vector, célula o composición inmunoterápica de MUC1-levadura *ex vivo*, (c) activar las PBMC obtenidas de un sujeto con las células dendríticas tratadas *ex vivo*, (d) aislar linfocitos T de las PBMC activadas *ex vivo*, y (e) administrar los linfocitos T aislados al sujeto, en el que se inhibe el cáncer que expresa MUC1 en el sujeto.

La divulgación proporciona el uso de células T sometidas a transferencia adoptiva estimuladas *in vitro* con una composición que comprende el péptido, ácido nucleico, vector, la célula o composición inmunoterápica de MUC1-levadura para tratar un cáncer, para inhibir un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto, para reducir, detener, revertir o prevenir la progresión metastásica de cáncer en un individuo que tiene cáncer, o para prevenir o retrasar la aparición de un cáncer que expresa MUC1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de inducción de una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto que comprende (a) administrar al sujeto un primer vector de poxvirus que comprende un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y (b) administrar al sujeto un segundo vector de poxvirus que comprende un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, el ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es un ácido nucleico que codifica para una proteína MUC1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 16).

25 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona péptidos que comprenden un epítipo de linfocitos T citotóxicos (CTL) humanos de la subunidad C-terminal de mucina 1 (MUC1) de antígeno asociado a tumor (TAA) humano y sus análogos, que pueden usarse en vacunas y otras composiciones para la prevención o el tratamiento terapéutico de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, un cáncer que expresa o sobreexpresa MUC1. En particular, la invención proporciona péptidos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en la secuencia de aminoácidos de KYHPMSEYAL (SEQ ID NO: 1).

En otra realización, la invención proporciona un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de MUC1 (es decir, una proteína MUC1) o un fragmento de la misma, en el que uno o más de los residuos de aminoácido correspondientes se han reemplazado por uno o más de los epítopos agonistas potenciadores de SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 16).

Generalmente, se entiende que un "polipéptido" es un polímero orgánico lineal que consiste en un gran número de residuos de aminoácido unidos entre sí en una cadena continua, sin ramificación, que forma parte de, o la totalidad de, una molécula de proteína. Generalmente, se considera que un "péptido" se distingue de una proteína o un polipéptido de longitud completa basándose en el tamaño y, en una realización, como punto de referencia arbitrario puede entenderse que contiene aproximadamente 50 aminoácidos o menos, mientras que los polipéptidos o las proteínas de longitud completa son generalmente más largos. Sin embargo, los términos "péptido" y "polipéptido" pueden usarse de manera indistinta en algunas realizaciones para describir una proteína útil en la presente invención, o puede usarse generalmente el término "proteína".

El péptido de la invención puede tener hasta 20 residuos de aminoácido de longitud. En una realización, un péptido de la invención tiene no más de 20 (por ejemplo, no más de 19, no más de 18, no más de 17, no más de 16, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11 o no más de 10) residuos de aminoácido. Los residuos de aminoácido adicionales, si están presentes, preferiblemente proceden de la proteína MUC1 (por ejemplo, MUC1-C) o se basan en la secuencia de MUC1 tal como se describe en el presente documento. Los residuos de aminoácido adicionales pueden situarse en cualquier extremo o en ambos extremos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Un polipéptido para la expresión en una célula huésped, tal como una levadura, tiene un tamaño mínimo que puede expresarse de manera recombinante en la célula huésped. Por consiguiente, el polipéptido de la divulgación que se expresa por la célula huésped tiene preferiblemente al menos 25 aminoácidos de longitud, y tiene normalmente al menos o más de 25 aminoácidos de longitud, o al menos o más de 26 aminoácidos, al menos o más de 27 aminoácidos, al menos o más de 28 aminoácidos, al menos o más de 29 aminoácidos, al menos o más de 30 aminoácidos, al menos o más de 31 aminoácidos, al menos o más de 32 aminoácidos, al menos o más de 33 aminoácidos, al menos o más de 34 aminoácidos, al menos o más de 35 aminoácidos, al menos o más de 36 aminoácidos, al menos o más de 37 aminoácidos, al menos o más de 38 aminoácidos, al menos o más de 39 aminoácidos, al menos o más de 40 aminoácidos, al menos o más de 41 aminoácidos, al menos o más de 42 aminoácidos, al menos o más de 43 aminoácidos, al menos o más de 44 aminoácidos, al menos o más de 45 aminoácidos, al menos o más de 46 aminoácidos, al menos o más de 47 aminoácidos, al menos o más de 48

aminoácidos, al menos o más de 49 aminoácidos, o al menos o más de 50 aminoácidos de longitud, o al menos 25-50 aminoácidos de longitud, al menos 30-50 aminoácidos de longitud, o al menos 35-50 aminoácidos de longitud, o al menos 40-50 aminoácidos de longitud, o al menos 45-50 aminoácidos de longitud, aunque pueden expresarse proteínas más pequeñas, y pueden expresarse proteínas considerablemente más grandes (por ejemplo, cientos de aminoácidos de longitud o incluso unos pocos miles de aminoácidos de longitud).

En otra realización, la invención proporciona un péptido que puede usarse en vacunas y otras composiciones para la prevención o el tratamiento terapéutico de un cáncer que expresa o que sobreexpresa MUC1, en el que el péptido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos de MUC1 o un fragmento de la misma (por ejemplo, un dominio inmunogénico de la misma), en el que uno o más de los residuos de aminoácido correspondientes del péptido se han reemplazado (por ejemplo, sustituido) de tal manera que el péptido comprende uno o más de los epítomos agonistas potenciadores de SEQ ID NO: 1 (es decir, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos de MUC1 nativa, o de tipo natural, en que la secuencia de aminoácidos del péptido comprende uno o más de los epítomos agonistas potenciadores, lo que implica normalmente la sustitución de uno, dos, tres aminoácidos o más en una secuencia de epítomo de tipo natural dada por un aminoácido diferente). En un aspecto de esta realización, el péptido puede comprender además epítomos agonistas potenciadores de MUC1 adicionales, de los que se describen ejemplos con detalle a continuación.

En algunas realizaciones de la invención, se usan péptidos de la invención como antígenos. Según la presente invención, el uso general en el presente documento del término "antígeno" se refiere a cualquier parte de una proteína (por ejemplo, péptido, proteína parcial, proteína de longitud completa), en el que se produce de manera natural la proteína o se diseña o se deriva de manera sintética, a una composición celular (célula completa, lisado celular o células rotas), a un organismo (organismo completo, lisado o células rotas), o a un hidrato de carbono, u otra molécula, o una parte de los mismos. Un antígeno puede provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células) frente a antígenos iguales o similares que se encuentran *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* por un elemento del sistema inmunitario (por ejemplo, células T, anticuerpos).

Un antígeno pueden ser tan sólo un único epítomo (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 descrita en el presente documento), un único dominio inmunogénico o más grande, y puede incluir múltiples epítomos o dominios inmunogénicos. Como tal, el tamaño de un antígeno de proteína puede tener tan sólo aproximadamente 8-11 aminoácidos (por ejemplo, un péptido) y tener hasta un dominio de una proteína, una proteína de longitud completa, un multímero, una proteína de fusión o una proteína quimérica. Los antígenos útiles en diversas composiciones inmunoterápicas descritas en el presente documento incluyen péptidos, polipéptidos, dominio(s) de proteína (por ejemplo, dominios inmunogénicos), subunidades de proteína, proteínas de longitud completa, multímeros, proteínas de fusión y proteínas quiméricas.

Cuando se hace referencia a estimulación de una respuesta inmunitaria, el término "inmunógeno" es un subconjunto del término "antígeno" y, por tanto, en algunos casos, puede usarse indistintamente con el término "antígeno". Un inmunógeno, tal como se usa en el presente documento, describe un antígeno que provoca una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células (es decir, es inmunogénico), de tal manera que la administración del inmunógeno a un individuo produce una respuesta inmunitaria específica de antígeno frente al mismo o antígenos similares con los que se encuentra el sistema inmunitario del individuo. En una realización, el inmunógeno provoca una respuesta inmunitaria mediada por células, incluyendo una respuesta de células T CD4⁺ (por ejemplo, TH1, TH2 y/o TH17) y/o una respuesta de células T CD8⁺ (por ejemplo, una respuesta de CTL).

Un "dominio inmunogénico" o "dominio inmunológico" de una proteína dada (polipéptido) puede ser cualquier parte, fragmento o epítomo de un antígeno (por ejemplo, un fragmento o una subunidad de un péptido o un epítomo de un anticuerpo u otro epítomo conformacional) que contiene al menos un epítomo que puede actuar como inmunógeno cuando se administra a un animal. Por tanto, un dominio inmunogénico es más grande que un único aminoácido y tiene al menos un tamaño suficiente como para contener al menos un epítomo que puede actuar como inmunógeno. Por ejemplo, una única proteína puede contener múltiples dominios inmunogénicos diferentes. No es necesario que los dominios inmunogénicos sean secuencias lineales dentro de una proteína, tal como en el caso de una respuesta inmunitaria humoral, en la que se contemplan dominios conformacionales.

En el presente documento, se define un epítomo como un único sitio inmunogénico dentro de un antígeno dado que es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria cuando se proporciona al sistema inmunitario en el contexto de células activadas y/o señales coestimuladoras apropiadas del sistema inmunitario. Dicho de otro modo, un epítomo es la parte de un antígeno que reconocen componentes del sistema inmunitario, y también puede denominarse un determinante antigénico. Los expertos en la técnica reconocerán que los epítomos de células T tienen diferente tamaño y composición que los epítomos de células B o anticuerpos, y que los epítomos presentados a través de la ruta del CMH de clase I difieren en tamaño y atributos estructurales con respecto a epítomos presentados a través de la ruta del CMH de clase II. Por ejemplo, los epítomos de células T presentados por moléculas de CMH de clase I tienen normalmente entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, mientras que los epítomos presentados por moléculas de CMH de clase II están menos restringidos en cuanto a longitud y pueden tener hasta 25 aminoácidos o más. Además, los epítomos de células T tienen características estructurales predichas que dependen de las moléculas de CMH específicas a las que se une el epítomo. Los epítomos pueden ser epítomos de

secuencia lineal o epítomos conformacionales (regiones de unión conservadas). La mayor parte de los anticuerpos reconocen epítomos conformacionales.

Un "antígeno diana" es un antígeno que se selecciona específicamente como diana por una composición inmunoterápica de la invención (es decir, un antígeno, habitualmente el antígeno nativo, frente al que se desea provocar una respuesta inmunitaria, aunque el antígeno usado en el agente inmunoterápico es un agonista del antígeno nativo). Un "antígeno de cáncer", que también se denomina antígeno asociado a tumor (TAA), es un antígeno que comprende al menos un antígeno que está asociado con un cáncer, tal como un antígeno expresado por una célula tumoral, de modo que la selección como diana del antígeno también selecciona como diana la célula tumoral y/o el cáncer. Un antígeno de cáncer puede incluir uno o más antígenos de una o más proteínas, incluyendo una o más proteínas asociadas a tumor. En particular, un "antígeno de MUC1" es un antígeno que se deriva, diseña o se produce a partir de una proteína MUC1 (incluyendo MUC1-N, MUC1-C o tanto MUC1-N como MUC1-C). Un "antígeno agonista de MUC1" es un antígeno derivado, diseñado o producido a partir de una proteína MUC1 (incluyendo MUC1-N, MUC1-C o tanto MUC1-N como MUC1-C) que incluye al menos un epítomo agonista, tal como los epítomos agonistas potenciadores descritos en el presente documento. Los epítomos agonistas potenciadores preferidos de la invención tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

MUC1 (que también puede denominarse "mucina-1", "antígeno DF3" o "HMFG1") es una glicoproteína grande expresada por la mayor parte de los tejidos secretores epiteliales en niveles basales y se expresa en altos niveles por tumores malignos con origen en células epiteliales. MUC1 se encuentra normalmente con la mayor frecuencia como proteína transmembrana de tipo I, polimórfica con un dominio extracelular grande (también denominada subunidad MUC1-N) que incluye números variables de repeticiones en tándem (VNTR; normalmente entre 20 y 125 repeticiones) que están altamente glicosiladas a través de uniones a O. La proteína MUC1 está codificada como un único transcrito, y luego se procesa de manera postraducciona en subunidades, conocidas como MUC1-N y MUC1-C, o subunidades α y β , respectivamente, que luego forman una proteína heterodimérica mediante una fuerte interacción no covalente de las dos subunidades. MUC1 se escinde en sus subunidades N y C-terminales dentro del dominio de "proteína de esperma de erizo de mar, enterocinasa y agrina" (SEA), un dominio de proteína altamente conservado que se nombró basándose en su identificación inicial en una proteína del esperma, en enterocinasa y en agrina, y que se encuentra en varias proteínas similares a mucina fuertemente glicosiladas que están normalmente ancladas a la membrana. La proteína MUC1 se escinde entre residuos de glicina y serina presentes en la secuencia GSVVV, lo que corresponde a las posiciones 1097-1101 de SEQ ID NO: 11, dentro del dominio SEA (Lillehoj *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307: 743-749 (2003); Parry *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283: 715-720 (2001); Wreschner *et al.*, *Protein Sci.*, 11: 698-706 (2002)).

La subunidad MUC1-C incluye el dominio extracelular (ED), que se glicosila y se une al ligando de galectina-3, que sirve a su vez como puente para asociar físicamente MUC1 con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y posiblemente otras tirosina cinasas receptoras. MUC1-C también comprende un dominio transmembrana (TM) y un dominio citoplasmático (CD) que contiene varios residuos de tirosina que, cuando se fosforilan, podrían actuar como motivos de unión para proteínas con dominios SH2 (para un análisis detallado de la proteína MUC1 y funciones conocidas y supuestas, véase Kufe, *Cancer Biol. & Ther.*, 7: 81-84 (2008)). Algunas variantes de corte y empalme alternativas de MUC1 (conocidas como MUC1/Y y MUC1/X, por ejemplo) son versiones "cortas" de MUC1 que carecen de la mayor parte de MUC1-N, incluyendo la región VNTR grande, pero que incluyen las regiones ED, TM y CD, así como el dominio SEA y partes de la región de secuencia señal N-terminal. No puede producirse la escisión dentro del dominio SEA en estas versiones cortas.

Se han notificado el aislamiento y la secuenciación de ADN y ADNc que codifican para MUC1 humana (véanse, por ejemplo, Siddiqui *et al.*, *PNAS*, 85: 2320-2323 (1998); Abe y Kufe, *PNAS*, 90: 282-286 (1993); Hareuveni *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 189(3): 475-486 (1990); Gendler *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265(25): 15286-15293 (1990); Lan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265(25): 15294-15299 (1990); Tsarfaty *et al.*, *Gene*, 93(2): 313-318 (1990); Lancaster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173(3): 1019-1029 (1990)). Se describe un ejemplo de una proteína precursora de MUC1 humana de longitud completa que contiene las regiones tanto MUC1-N como MUC1-C en el n.º de registro de SwissProt P15941.3 (GI:296439295), y se representa en el presente documento mediante SEQ ID NO: 5. Pueden crearse 10 isoformas de MUC1 diferentes a partir del gen que codifica para SEQ ID NO: 5 mediante corte y empalme de transcrito alternativo. Por ejemplo, una isoforma conocida como MUC1/Y carece de las posiciones 54-1053 de SEQ ID NO: 5. Se describen otras diversas isoformas en la descripción de la base de datos de esta proteína.

Una variedad de variantes de transcrito de MUC1 se conocen, pero las subunidades, los dominios o las regiones de MUC1 descritos en la SEQ ID NO: 5 a modo de ejemplo anterior pueden identificarse fácilmente en las variantes, de tal manera que puede diseñarse o producirse un antígeno de MUC1 útil en la invención basándose en una secuencia de MUC1 dada, o una secuencia correspondiente de otra proteína MUC1. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína MUC1 humana se representa en el presente documento mediante SEQ ID NO: 6, que corresponde al n.º de registro de GENBANK® NM_002456.4 (GI: 65301116). SEQ ID NO: 6 codifica para una proteína MUC1 humana de 273 aminoácidos (variante de transcrito 1, también conocida como MUC1/ZD), cuya secuencia de aminoácidos se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 7 (también se encuentra en el n.º de registro de GENBANK® NP_002447.4; GI:65301117). Otra secuencia de nucleótidos que codifica para otra proteína MUC1 humana se representa en el presente documento mediante SEQ ID NO: 8, que corresponde al

n.º de registro de GENBANK® NM_001018016.1 (GI:67189006). SEQ ID NO: 8 codifica para una proteína MUC1 humana de 264 aminoácidos (variante de transcrito 2, también conocida como "MUC1/Y"), cuya secuencia de aminoácidos se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 9 (también se encuentra en el n.º de registro de GENBANK® NP_001018016.1; GI:67189007). Otra secuencia de nucleótidos que codifica para otra proteína MUC1 humana se representa en el presente documento mediante SEQ ID NO: 10, que corresponde al n.º de registro de GENBANK® AY327587.1 (GI:33150003). SEQ ID NO: 10 codifica para una proteína MUC1 humana de 264 aminoácidos (variante de transcrito 2, también conocida como "MUC1/Y"), cuya secuencia de aminoácidos se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 11 (también se encuentra en el n.º de registro de GENBANK® AAP97018.1 (GI: 33150004). Otra secuencia de nucleótidos que codifica para otra proteína MUC1 humana se representa en el presente documento mediante SEQ ID NO: 12, que corresponde al n.º de registro de GENBANK® NM_001018017 (GI:324120954). SEQ ID NO: 12 codifica para una proteína MUC1 humana de 255 aminoácidos (variante de transcrito 3), cuya secuencia de aminoácidos se representa en el presente documento como SEQ ID NO: 13 (también se encuentra en el n.º de registro de GENBANK® NP_001018017.1; GI:67189069). Aun otra secuencia de aminoácidos de MUC1 de tipo natural a modo de ejemplo se representa en el presente documento mediante SEQ ID NO: 14 (también se encuentra en el n.º de registro de GENBANK® NP_001191214). SEQ ID NO: 14 se usa como referencia para algunas de las posiciones de aminoácido de MUC1 descritas en el presente documento, pero los expertos en la técnica pueden identificar las posiciones correspondientes en otras secuencias de MUC1.

MUC1 humana, incluyendo las proteínas MUC1 humanas y los antígenos de MUC1 descritos en el presente documento, contiene diversos epítomos de células T CD4⁺ y CD8⁺. Tales epítomos de células T se han descrito, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.546.643; la patente estadounidense n.º 7.118.738; la patente estadounidense n.º 7.342.094; la patente estadounidense n.º 7.696.306; y publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0063653, así como en la publicación PCT n.º WO 2013/024972, y uno cualquiera o más de estos epítomos pueden usarse en un antígeno de MUC1 de la presente invención, incluyendo mediante la adición, delección o sustitución de uno o más aminoácidos dentro de una secuencia descrita en el presente documento para adaptarse a la secuencia con respecto a la secuencia del epítomo publicada en esa(s) posición/posiciones.

Se proporcionan en el presente documento ejemplos de antígenos agonistas de MUC1 descubiertos en la presente invención (véanse los ejemplos). Un péptido útil en la presente invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el péptido agonista potenciador de MUC1 representado por SEQ ID NO: 1. Sin embargo, otros epítomos agonistas de MUC1 puede estar incluidos adicionalmente en un antígeno de MUC1 para su uso en la presente invención. En una realización de la divulgación, un antígeno agonista de MUC1 adecuado para su uso en la presente invención comprende una proteína MUC1 o polipéptido o péptido de la misma que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de la proteína MUC1 de tipo natural (nativa) o polipéptido o péptido de la misma en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 sustituciones de aminoácido o más, en las que las sustituciones de aminoácido introducen uno o más epítomos agonistas de MUC1 en el antígeno. Tales sustituciones de aminoácido pueden incluir sustituciones en las siguientes posiciones de aminoácido, en las que se proporcionan las posiciones de las sustituciones con respecto a una MUC1 de tipo natural que tiene una secuencia de aminoácidos representada por el n.º de registro NP_001191214 (SEQ ID NO: 14) (aunque pueden identificarse fácilmente posiciones iguales o equivalentes en cualquier otra secuencia de MUC1 de tipo natural): T93, A161, P162, G169, S170, T171, A392, C406, T422, P430, T431, T444, D445, S460, S462 y/o A470. En una realización, la sustitución es: T93L, A161Y, P162L, G169V, S170Y, T171L, A392Y, C406V, T422K, P430A, T431L, T444L, D445F, S460Y, S462K y/o A470L.

Además, un antígeno de MUC1 útil en la presente divulgación puede incluir una o más mutaciones de aminoácido (sustituciones, inserciones o delecciones) adicionales, por ejemplo, para inactivar o deleccionar una función biológica natural de la proteína nativa (por ejemplo, para mejorar la expresión o potenciar la seguridad del antígeno). Un ejemplo de tal mutación es una mutación inactivante que es una sustitución en la posición C404 con respecto a la proteína de tipo natural usando SEQ ID NO: 14 como secuencia de referencia. En un aspecto, la sustitución inactivante es C404A (con respecto a SEQ ID NO: 14).

El péptido de la invención puede prepararse mediante cualquier método, tal como sintetizando el péptido o expresando un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos apropiada para el péptido en una célula y, en algunas realizaciones, recogiendo el péptido de la célula. En algunas realizaciones, el péptido no se recoge de la célula, tal como en realizaciones de la invención referidas a una composición para inmunoterapia basada en levadura, que se describe con detalle a continuación. También puede usarse una combinación de tales métodos de producción de péptidos. Se conocen en la técnica métodos de síntesis *de novo* de péptidos y métodos de producción de manera recombinante de péptidos (véanse, por ejemplo, Chan *et al.*, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood *et al.*, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994).

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico

que codifica para el péptido. La molécula de ácido nucleico puede comprender ADN (genómico o ADNc) o ARN, y puede ser mono o bicatenaria. Además, la molécula de ácido nucleico puede comprender análogos o derivados de nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de inosina o fosforotioato y similares). La secuencia de ácido nucleico puede codificar para el péptido solo o como parte de una proteína de fusión. La secuencia de ácido nucleico que codifica para el péptido puede proporcionarse como parte de un constructo que comprende la molécula de ácido nucleico y elementos que permiten el suministro de la molécula de ácido nucleico a una célula, y/o la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula. Tales elementos incluyen, por ejemplo, vectores de expresión, promotores y secuencias de control de la transcripción y/o traducción. Tales constructos también pueden denominarse "moléculas de ácido nucleico recombinantes". Se conocen en la técnica vectores, promotores, secuencias para la transcripción/traducción, y otros elementos adecuados, así como métodos de preparación de tales moléculas de ácido nucleico y constructos, (por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente; y Ausubel *et al.*, citado anteriormente). Aunque la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula física de ácido nucleico y la expresión "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, pueden usarse indistintamente las dos expresiones, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, o una secuencia de ácido nucleico, que puede codificar para un péptido o polipéptido. De manera similar, la expresión "molécula de ácido nucleico recombinante" se refiere principalmente a una molécula de ácido nucleico operativamente unida a un elemento tal como una secuencia de control de la transcripción, pero puede usarse indistintamente con la expresión "molécula de ácido nucleico".

La invención proporciona además un vector que comprende la molécula de ácido nucleico. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN) y vectores virales, tales como poxvirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, poliovirus, alfavirus, baculovirus y virus Sindbis.

En una primera realización, el vector es un plásmido (por ejemplo, plásmido de ADN). El plásmido puede completarse con quitosano.

En una segunda realización, el vector es un poxvirus (por ejemplo, vectores de cordopoxvirus y vectores de entomopoxvirus). Los poxvirus adecuados incluyen ortopox, avipox, parapox, yatapox y moluscipox, viruela del mapache, viruela del conejo, capripox (por ejemplo, viruela ovina), leporipox y suipox (por ejemplo, viruela porcina). Los ejemplos de virus avipox incluyen viruela aviar, viruela de la paloma, viruela del canario, tal como ALVAC, viruela del mainate, viruela desconocida, viruela de la codorniz, viruela del pavo real, viruela del pingüino, viruela del gorrión, viruela del estornino y viruela del pavo. Los ejemplos de ortopoxvirus incluyen viruela (también conocida como variola), viruela vacuna, viruela de los simios, vaccinia, ectromelia, viruela del camello, viruela del mapache, y derivados de los mismos.

El término "virus vaccinia" se refiere a tanto al virus vaccinia de tipo natural como a cualquiera de las diversas cepas atenuadas o aisladas que se aíslan posteriormente incluyendo, por ejemplo, vaccinia Ankara modificado (MVA), NYVAC, TROYVAC, Dry-Vax (también conocido como virus vaccinia-Wyeth), POXVAC-TC (Schering-Plough Corporation), virus vaccinia-Western Reserve, virus vaccinia-EM63, virus vaccinia-Lister, virus vaccinia-New York City Board of Health, virus vaccinia-Temple of Heaven, virus vaccinia-Copenhagen, ACAM1000, ACAM2000 y virus vaccinia Ankara-Bavarian Nordic modificado ("MVABN").

En determinadas realizaciones, el MVA se selecciona del grupo que consiste en MVA-572, depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares de Animales ("ECACC"), los Servicios de Microbiología de la Agencia de Protección de la Salud, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, Reino Unido ("R.U."), con el número de depósito ECACC 94012707 el 27 de enero de 1994; MVA-575, depositado en la ECACC con el número de depósito ECACC 00120707 el 7 de diciembre de 2000; MVA-Bavarian Nordic ("MVA-BN"), depositado en la ECACC con el número de depósito V00080038 el 30 de agosto de 2000; y derivados de MVA-BN. Se describen vectores de poxvirus a modo de ejemplo adicionales en la patente estadounidense n.º 7.211.432.

Se generó el virus vaccinia MVA mediante 516 pases en serie con fibroblastos de embrión de pollo de la cepa Ankara de virus vaccinia, denominado virus Ankara de corioalantoides (CVA) (véase Mayr *et al.*, *Infection*, 3: 6-14 (1975)). El genoma del MVA atenuado resultante carece de aproximadamente 31 kilopares de bases de ADN genómico en comparación con la cepa de CVA parental y está altamente restringido en cuanto a célula huésped a células aviares (véase Meyer *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 72: 1031-1038 (1991)). Se mostró en una variedad de modelos animales que el MVA resultante era significativamente avirulento (Mayr *et al.*, *Dev. Biol. Stand.*, 41: 225-34 (1978)). Se ha sometido a prueba esta cepa de MVA en ensayos clínicos como vacuna para inmunizar frente a la viruela en seres humanos (véanse Mary *et al.*, *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B.*, 167: 375-390 (1987); y Stickl *et al.*, *Dtsch. Med. Wschr.*, 99: 2386-2392 (1974)). Esos estudios implicaron a más de 120.000 seres humanos, incluyendo pacientes de alto riesgo, y demostraron que en comparación con vacunas basadas en virus vaccinia, MVA había disminuido la virulencia o infectividad mientras que todavía podía inducir una buena respuesta inmunitaria específica. Aunque se prefiere MVA-BN por su mejor perfil de seguridad porque es menos competente en la replicación que otras cepas de MVA, todos los MVA son adecuados para esta invención, incluyendo MVA-BN y sus derivados.

Tanto MVA como MVA-BN pueden replicar de manera eficaz su ADN en células de mamífero aunque sean avirulentos. Este rasgo es el resultado de perder dos genes de la gama de huéspedes importantes entre al menos

25 mutaciones y deleciones adicionales que se produjeron durante sus pases a través de fibroblastos de embrión de pollo (véanse Meyer *et al.*, *Gen. Virol.*, 72: 1031-1038 (1991); y Antoine *et al.*, *Virol.*, 244: 365-396 (1998)). En contraposición a la cepa atenuada Copenhagen (NYVAC) y avipox restringido en cuanto a la gama de huéspedes (ALVAC), no se ven afectadas la transcripción ni temprana ni tardía en MVA, lo que permite la expresión génica
 5 continua en la totalidad del ciclo de vida viral (véase Sutter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 89: 10847-10851 (1992)). Además, puede usarse MVA en condiciones de inmunidad de poxvirus preexistente (Ramirez *et al.*, *J. Virol.*, 74: 7651-7655 (2000)).

Tanto MVA como MVA-BN carecen de aproximadamente el 15% (31 kb de seis regiones) del genoma en
 10 comparación con el ancestral virus vaccinia Ankara de corioalantoides ("CVA"). Las deleciones afectan a varios genes de virulencia y de gama de huéspedes, así como el gen para cuerpos de inclusión de tipo A. MVA-BN puede fijarse a y entrar en células humanas en las que se expresan muy eficazmente genes codificados por virus. Sin embargo, no se producen el ensamblaje y la liberación de virus de progenie. MVA-BN se adapta enormemente a células de fibroblastos de embrión de pollo primarios (CEF) y no se replica en células humanas. En células
 15 humanas, se expresan genes virales, y no se produce virus infeccioso. A pesar de su alta atenuación y virulencia reducida, en estudios preclínicos, se ha mostrado que MVA-BN provoca respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares frente a vaccinia y a productos génicos heterólogos codificados por genes clonados en el genoma de MVA (véanse Harrer *et al.*, *Antivir. Tier.*, 10(2): 285-300 (2005); Cosma *et al.*, *Vaccine*, 22(1): 21-29 (2003); Di Nicola *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 14(14): 1347-1360 (2003); y Di Nicola *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 10(16): 5381-5390 (2004)).

La replicación reproductiva de un virus se expresa normalmente mediante la razón de amplificación. El término
 "razón de amplificación" se refiere a la razón de virus producido a partir de una célula infectada ("salida") con
 respecto a la cantidad usada originariamente para infectar las células en primer lugar ("entrada"). Una razón de
 25 amplificación de "1" define un estado de amplificación en el que la cantidad de virus producido a partir de células infectadas es igual a la cantidad usada inicialmente para infectar las células, lo que significa que las células infectadas son permisivas para la infección y reproducción viral. Una razón de amplificación de menos de 1 significa que las células infectadas producen menos virus que la cantidad usada para infectar las células en primer lugar, e indica que el virus carece de la capacidad de replicación reproductiva, que es una medida de la atenuación viral.

Por tanto, el término "no puede producir replicación reproductiva" significa que un MVA o derivado de MVA tiene una
 30 razón de amplificación de menos de 1 en una o más líneas celulares humanas, tales como, por ejemplo, la línea celular 293 de riñón embrionario humano (HEK293, que se deposita con el número de depósito ECACC n.º 85120602), la línea celular de osteosarcoma óseo humano 143B (depositada con el número de depósito ECACC n.º 91112502), la línea celular de adenocarcinoma cervicouterino humano HeLa (depositada en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATTC) con el número de depósito ATCC n.º CCL-2), y la línea celular de queratinocitos humanos HaCat (véase Boukamp *et al.*, *J. Cell Biol.*, 106(3): 761-71 (1988)).

MVA-BN no se replica de manera reproductiva en las líneas celulares humanas HEK293, 143B, HeLa y HaCat
 40 (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 6.761.893 y 6.193.752, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2002/042480). Por ejemplo, en un experimento a modo de ejemplo, MVA-BN presentó una razón de amplificación de 0,05 a 0,2 en células HEK293, una razón de amplificación de 0,0 a 0,6 en células 143B, una razón de amplificación de 0,04 a 0,8 en células HeLa, y una razón de amplificación de 0,02 a 0,8 en células HaCat. Por tanto, MVA-BN no se replica de manera reproductiva en ninguna de las líneas celulares humanas HEK293, 143B, HeLa y HaCat. En cambio, la razón de amplificación de MVA-BN es de más de 1 en cultivos
 45 primarios de células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y en células de riñón de hámster recién nacido (BHK, que se deposita con el número de depósito ATCC n.º CRL-1632). Por tanto, MVA-BN puede propagarse fácilmente y amplificarse en cultivos primarios de CEF con una razón de amplificación por encima de 500, y en células BHK con una razón de amplificación por encima de 50.

Tal como se indicó anteriormente, todos los MVA son adecuados para esta invención, incluyendo MVA-BN y sus
 50 derivados. El término "derivados" se refiere a virus que muestran esencialmente las mismas características de replicación que la cepa depositada ante la ECACC el 30 de agosto de 2000, con el número de depósito ECACC n.º V00080038 pero que muestra diferencias en una o más partes de su genoma. Los virus que presentan las mismas "características de replicación" que los virus depositados son virus que se replican con razones de amplificación
 55 similares a la de la cepa depositada en células CEF, en células BHK y en las líneas celulares humanas HEK293, 143B, HeLa y HaCat.

Cuando el vector es para la administración a un huésped (por ejemplo, ser humano), el vector (por ejemplo, poxvirus) preferiblemente tiene una baja eficiencia replicativa en una célula diana (por ejemplo, se producen no más de aproximadamente 1 progenie por célula o, más preferiblemente, no más de 0,1 progenie por célula). La eficiencia de replicación puede determinarse fácilmente de manera empírica determinando el título viral después de la
 60 infección de la célula diana.

Además de la molécula de ácido nucleico que codifica para el péptido que comprende, que consiste esencialmente
 65 en, o que consiste en al menos un epítipo agonista potenciador de MUC1 descrito en el presente documento), un vector útil en la invención (por ejemplo, un plásmido o un vector viral) también puede comprender una secuencia de

ácido nucleico que codifica para una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), citocinas y/o moléculas que pueden potenciar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, antígenos asociados a tumor adicionales). Los antígenos asociados a tumor adicionales (TAA, también denominado antígenos de cáncer) adicionales incluyen, pero no se limitan a, 5- α -reductasa, α -fetoproteína (AFP), AM-1, APC, April, gen de antígeno de melanoma B (BAGE), β -catenina, Bc112, bcr-abl, Brachyury, CA-125, caspasa-8 (CASP-8 también conocida como FLICE), catepsinas, CD 19, CD20, CD21/receptor del complemento 2 (CR2), CD22/BL-CAM, CD23/Fc ϵ RII, CD33, CD35/receptor del complemento 1 (CR1), CD44/PGP-1, CD45/antígeno común leucocitario (LCA), CD46/proteína cofactor de membrana (MCP), CD52/CAMPATH-1, CD55/factor acelerador de la degradación (DAF), CD59/protectina, CDG27, CDK4, antígeno carcinoembrionario (CEA), c-myc, ciclooxigenasa-2 (cox-2), delecionada en el gen de cáncer colorrectal (DCC), DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, farnesil transferasa, factor de crecimiento de fibroblastos-8a (FGF8a), factor de crecimiento de fibroblastos-8b (FGF8b), FLK-1/KDR, receptor de ácido fólico, G250, familia de genes de antígeno de melanoma G (familia de GAGE), gastrina 17, hormona liberadora de gastrina, gangliósido 2 (GD2)/gangliósido 3 (GD3)/gangliósido-monoácido siálico-2 (GM2), hormona liberadora de gonadotropina (Gn-RH), UDP-GlcNAc:R₁Man(α 1-6)R₂ [GlcNAc a Man(α 1-6)] β 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa V (GnT V), GP1, gp100/Pme117, gp-100-in4, gp15, gp75/proteína relacionada con tirosina-1 (gp75/TRP-1), gonadotropina coriónica humana (hCG), heparanasa, Her2/neu, virus de tumor de mama humano (HMTV), proteína de choque térmico de 70 kiloDalton (HSP70), transcriptasa inversa-telomerasa humana (hTERT), receptor 1 del factor de crecimiento similar a insulina (IGFR-1), receptor de interleucina-13 (IL-13R), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, familia que codifica para el antígeno de melanoma (familia de MAGE, incluyendo al menos MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 y MAGE-4), mamaglobina, MAP 17, Melan-A/antígeno de melanoma reconocido por células T-1 (MART-1), mesotelina, MIC A/B, las MT-MMP, mucina, antígeno específico de testículos NY-ESO-1, osteonectina, p15, P170/MDR1, p53, p97/melanotransferrina, PAI-1, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), μ PA, PRAME, probasina, progenipoyetina, antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), RAGE-1, Rb, RCAS1, Ras mutado, SART-1, familia de SSX, STAT3, STn, TAG-72, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), timosina-beta-15, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), TP1, TRP-2, tirosinasa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ZAG, p16INK4 y glutatión-S-transferasa (GST), así como versiones modificadas de los mismos (por ejemplo, CEA-6D).

En el caso de un vector viral, el ácido nucleico que codifica para el péptido, así como cualquier otro gen exógeno, se insertan preferiblemente en un sitio o una región (región de inserción) en el vector (por ejemplo, poxvirus) que no afecta a la viabilidad viral del virus recombinante resultante. Tales regiones pueden identificarse fácilmente sometiendo a prueba segmentos de ADN viral para regiones que permiten la formación recombinante sin afectar gravemente a la viabilidad viral del virus recombinante.

El gen de timidina cinasa (TK) es una región de inserción que puede usarse fácilmente y está presente en muchos virus. En particular, se ha encontrado el gen TK en todos los genomas de poxvirus examinados. Se describen sitios de inserción adicionales adecuados en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2005/048957. Por ejemplo, en la viruela aviar, las regiones de inserción incluyen, pero no se limitan a, el fragmento BamHI J, el fragmento EcoRI-HindIII, el fragmento BamHI, el fragmento EcoRV-HindIII, los sitios de inserción de secuencia única larga (LUS) (por ejemplo, FPV006/FPV007 y FPV254/FPV255), el sitio de inserción de FP14 (FPV060/FPV061), y el sitio de inserción de 43K (FPV107/FPV108). En vaccinia, los sitios de inserción incluyen, pero no se limitan a, 44/45, 49/50 y 124/125.

Cuando el vector es un virus de viruela aviar recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica para el péptido y/u otro(s) gen(es) exógeno(s) (por ejemplo, que codifica(n) para una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras), el ácido nucleico que codifica para el péptido puede insertarse en una región (por ejemplo, la región FP14), y el/los gen(es) exógeno(s) puede(n) insertarse en otra región (por ejemplo, la región BamHI J).

El vector de la invención puede incluir promotores y elementos reguladores adecuados, tales como un elemento regulador de la transcripción o un potenciador. Los promotores adecuados incluyen el promotor temprano de SV40, un promotor de RSV, la LTR de retrovirus, el promotor mayor tardío de adenovirus, el promotor I precoz de CMV humano, y diversos promotores de poxvirus, tales como el promotor Pr7.5K, el promotor 30K, el promotor 40K, el promotor I3, el promotor Prs, el promotor PrsSynIIIm, el promotor PrLE, el promotor temprano/tardío sintético (SE/I), el promotor HH, el promotor 11K y el promotor Pi. Aunque los promotores serán normalmente promotores constitutivos, también pueden usarse promotores inducibles en los vectores de la invención. Tales sistemas inducibles permiten la regulación de la expresión génica.

En una realización de la invención, también se proporciona en el presente documento una célula que comprende (1) el péptido (2) una molécula de ácido nucleico que codifica para el péptido, y/o (3) un vector que comprende la molécula de ácido nucleico. Las células adecuadas incluyen células procariotas y eucariotas, por ejemplo, células de mamífero, levaduras, hongos distintos de levaduras, y bacterias (tales como *E. coli*). La célula puede usarse *in vitro*, tal como para investigación o para la producción del péptido, o la célula puede usarse *in vivo*. En una realización, la

célula es una célula de levadura, que puede usarse para proporcionar un componente de vehículo de levadura de la composición para inmunoterapia basada en levadura tal como se describe en el presente documento. En otra realización, la célula puede ser una célula presentadora de antígeno pulsada con péptido. Las células presentadoras de antígeno adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células dendríticas, linfocitos B, monocitos, macrófagos, y similares.

En una realización, la célula es una célula dendrítica. Pueden aislarse células dendríticas de diferentes etapas de maduración basándose en marcadores de expresión de superficie celular. Por ejemplo, las células dendríticas maduras tienen menor capacidad para capturar nuevas proteínas para la presentación pero tienen una capacidad mucho mayor de estimulación de células T en reposo para que crezcan y se diferencien. Por tanto, las células dendríticas maduras pueden ser de importancia. Pueden identificarse células dendríticas maduras por su cambio en la morfología y por la presencia de diversos marcadores. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores de superficie celular tales como B7.1, B7.2, CD40, CD11, CD83 y CMH de clase II. Alternativamente, puede identificarse la maduración observando o midiendo la producción de citocinas proinflamatorias.

Pueden recogerse células dendríticas y analizarse usando técnicas y dispositivos de clasificación celular y citofluorografía normales, tales como un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS). Están disponibles comercialmente anticuerpos específicos para antígenos de superficie celular de diferentes etapas de maduración de células dendríticas.

En una realización, la célula es una levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*). Por consiguiente, la invención también proporciona una composición inmunoterápica basada en levadura que comprende (a) un vehículo de levadura y (b) un antígeno que comprende a MUC1 péptido de la invención (también denominada generalmente en el presente documento "composición para inmunoterapia con levadura", "producto para inmunoterapia con levadura", "composición inmunoterápica con levadura", "vacuna basada en levadura", o derivados de estas expresiones). Una composición inmunoterápica basada en levadura que contiene un antígeno de MUC1 puede denominarse más específicamente "composición inmunoterápica de MUC1-levadura" o derivados de la misma tal como se indicó anteriormente. Una "composición inmunoterápica" es una composición que provoca una respuesta inmunitaria suficiente para lograr al menos un beneficio terapéutico en un sujeto. Una "composición inmunoterápica basada en levadura" (y derivados de la misma) se refiere a una composición que incluye un componente de vehículo de levadura y un componente de antígeno, y puede provocar o inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria celular, incluyendo sin limitación una respuesta inmunitaria celular mediada por células T. La respuesta inmunitaria incluye generalmente tanto una respuesta inmunitaria innata como una respuesta inmunitaria adaptativa, y se genera tanto frente al componente de levadura como frente al componente de antígeno (una respuesta inmunitaria específica de antígeno). Preferiblemente, la composición inmunoterápica basada en levadura, cuando se administra a un individuo, proporciona al menos un beneficio protector, preventivo o terapéutico al individuo. En un aspecto, una composición inmunoterápica basada en levadura útil en la invención puede inducir una respuesta inmunitaria mediada por células T CD8⁺ y/o por CD4⁺ y en un aspecto, respuesta inmunitaria mediada por células T CD8⁺ y una por CD4⁺, particularmente frente a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de cáncer, y preferiblemente frente a MUC1). Una respuesta inmunitaria CD4⁺ puede incluir respuestas inmunitarias TH1, respuestas inmunitarias TH2, respuestas inmunitarias TH17, o cualquier combinación de las anteriores. Una respuesta inmunitaria CD8⁺ puede incluir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL). En un aspecto, una composición inmunoterápica basada en levadura modula el número y/o la funcionalidad de células T reguladoras (Treg) en un sujeto.

Tal como se describió anteriormente, una composición para inmunoterapia basada en levadura de la invención incluye (a) un vehículo de levadura y (b) al menos un antígeno de cáncer que comprende un antígeno de MUC1 o dominio inmunogénico del mismo, en la que el antígeno de MUC1 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, al menos un epítipo agonista potenciador de MUC1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1. El antígeno de cáncer se expresa por (es decir, de manera recombinante), se fija a, se carga en o se mezcla con el vehículo de levadura.

En algunas realizaciones, el antígeno de cáncer, antígeno de MUC1, o dominio inmunogénico del mismo se proporciona como una proteína de fusión. Por ejemplo, se han descrito varias proteínas MUC1 y proteínas de fusión en la publicación PCT n.º WO 2013/024972. Tales proteínas y proteínas de fusión pueden modificarse adicionalmente para que incorporen los epítipos agonistas potenciadores de la presente invención. En algunas realizaciones, el antígeno de cáncer y el antígeno de MUC1 son el mismo elemento. En algunas realizaciones, el antígeno de cáncer incluye otros antígenos, incluyendo otros antígenos de cáncer (también denominados en el presente documento antígenos asociados a tumor o TAA) además del antígeno de MUC1. En un aspecto de la invención, una proteína de fusión útil como un antígeno de cáncer puede incluir dos o más antígenos, por ejemplo, un antígeno de MUC1 y otro antígeno de cáncer (TAA) que no es un antígeno de MUC1, o dos antígenos de MUC1 diferentes. En un aspecto, la proteína de fusión puede incluir dos o más dominios inmunogénicos de uno o más antígenos, tales como dos o más dominios inmunogénicos de un antígeno de MUC1, o dos o más epítipos de uno o más antígenos, tales como dos o más epítipos de un antígeno de MUC1. Una variedad de otros antígenos de cáncer o TAA se conocen en la técnica y se describen en otra parte en el presente documento.

Un ejemplo de un antígeno de MUC1 que es útil en una composición para inmunoterapia basada en levadura de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende un antígeno de MUC1 para su uso en una composición para inmunoterapia basada en levadura, en la que el antígeno de MUC1 es una proteína agonista de MUC1 de longitud completa correspondiente a una proteína MUC1 de tipo natural excepto por (a) la introducción de 15 sustituciones de aminoácido para formar varios epítomos agonistas dentro de la proteína, incluyendo el epítomo agonista potenciador de SEQ ID NO: 1 y (b) una única sustitución de aminoácido que es una mutación inactivante. SEQ ID NO: 16 incluye las siguientes secuencias en el siguiente orden del extremo N-terminal al C-terminal: (1) una secuencia líder de factor alfa de SEQ ID NO:17 (correspondiente a las posiciones 1-89 de SEQ ID NO: 16); (2) una secuencia ligadora de Thr-Ser para facilitar la clonación (correspondiente a las posiciones 90-91 de SEQ ID NO: 16); (3) una proteína agonista de MUC1 de longitud completa correspondiente a una proteína de tipo natural excepto por la introducción de las 15 sustituciones agonistas de aminoácido mencionadas anteriormente y una sustitución inactivante (correspondiente a las posiciones 92-566 de SEQ ID NO: 16) y (4) una cola de histidina hexapeptídica (correspondiente a las posiciones 567-572 de SEQ ID NO: 16).

SEQ ID NO: 16 está codificada por la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15 (con optimización de codones para la expresión en levadura). La secuencia líder alfa (correspondiente a las posiciones 1-89 de SEQ ID NO: 16) podría sustituirse por una secuencia N-terminal diferente diseñada para conferir resistencia a la degradación proteasómica y/o estabilizar la expresión, tal como el péptido representado por SEQ ID NO: 19 o un péptido N-terminal de una secuencia líder alfa de levadura diferente, tal como SEQ ID NO: 18, o por una secuencia señal de MUC1. La cola C-terminal de hexahistidina es opcional y facilita la identificación y/o purificación de la proteína.

En comparación con la proteína MUC1 de tipo natural usada como molde, la secuencia de SEQ ID NO: 16 contiene las siguientes sustituciones de aminoácido: (se facilitan las posiciones de sustitución con referencia a SEQ ID NO: 16 con referencia adicional entre paréntesis a la ubicación de la sustitución en una MUC1 de tipo natural representada por el n.º de registro NP_001191214 correspondiente a SEQ ID NO: 14): T184L (posición 93 en MUC1 de tipo natural), A232Y (posición 161 en MUC1 de tipo natural), P233L (posición 162 en MUC1 de tipo natural), G240V (posición 169 en MUC1 de tipo natural), S241Y (posición 170 en MUC1 de tipo natural), T242L (posición 171 en MUC1 de tipo natural), A483Y (posición 392 en MUC1 de tipo natural), C495A (posición 404 en MUC1 de tipo natural) C497V (posición 406 en MUC1 de tipo natural), T513K (posición 422 en MUC1 de tipo natural), P521A (posición 430 en MUC1 de tipo natural), T522L (posición 431 en MUC1 de tipo natural), T535L (posición 444 en MUC1 de tipo natural), D536F (posición 445 en MUC1 de tipo natural), y S551Y (posición 460 en MUC1 de tipo natural). La sustitución C495A (posición 404 en la proteína MUC1 de tipo natural) es la mutación inactivante; el resto de las sustituciones son para producir epítomos agonistas.

SEQ ID NO: 16 comprende el péptido agonista potenciador denominado en el presente documento SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 está ubicada en las posiciones 513-522 de SEQ ID NO: 16.

El antígeno de MUC1 para inmunoterapia basada en levadura representado por SEQ ID NO: 16 contiene epítomos agonistas para varios tipos de HLA diferentes, incluyendo A2, A3 y A24, haciendo que sea un antígeno versátil y único para seleccionar como diana tumores en una variedad de individuos con un cáncer que expresa MUC1.

Un antígeno de MUC1 útil en la composición para inmunoterapia basada en levadura de la presente invención también incluye antígenos que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 en la longitud completa de la proteína de fusión o en un fragmento definido de SEQ ID NO: 16 (por ejemplo, un dominio inmunológico o dominio funcional (dominio con al menos una actividad biológica)) que forma parte de la proteína, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones 92-566 de SEQ ID NO: 16 (el antígeno de MUC1 dentro de SEQ ID NO: 16).

Resulta sencillo usar las partes correspondientes de cualquiera de las proteínas MUC1 que se derivan u obtienen a partir de secuencias o fuentes distintas de las ejemplificadas en el presente documento, y particularmente a partir de secuencias o fuentes dentro de la misma especie animal, para crear péptidos, polipéptidos y proteínas de fusión que tienen una estructura global similar o igual a la de los péptidos, polipéptidos y proteínas de fusión descritos en el presente documento. A modo de ejemplo, puede identificarse fácilmente una secuencia correspondiente en una proteína MUC1 humana dada de cualquier fuente que corresponde a las posiciones 92-566 de SEQ ID NO: 16 usando procedimientos o herramientas de alineación de secuencias simples. Por tanto, las secuencias con diferencias menores y/o conservativas con respecto a las secuencias ejemplificadas en el presente documento están abarcadas expresamente por la presente invención.

Tal como se analizó anteriormente, las secuencias de expresión N-terminal y las C-terminales, tales como las descritas anteriormente con respecto a la proteína de fusión de SEQ ID NO: 16 son opcionales, pero pueden seleccionarse de varias secuencias diferentes para mejorar o ayudar en la expresión, estabilidad, y/o permitir la identificación y/o purificación de la proteína. Por ejemplo, una secuencia sintética N-terminal a modo de ejemplo que potencia la estabilidad de expresión de un antígeno en una célula de levadura y/o impide la modificación

postraduccional de la proteína en la levadura incluye la secuencia M-A-D-E-A-P (representada en el presente documento por SEQ ID NO: 19). En otras realizaciones, el antígeno de MUC1 se une en el extremo N-terminal a una proteína de levadura, tal como una secuencia prepro de factor alfa (también denominada la secuencia líder señal de factor alfa, cuya secuencia de aminoácidos se ejemplifica en el presente documento por SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18). Se conocen en la técnica otras secuencias para la secuencia prepro de factor alfa de levadura y están abarcadas para su uso en la presente invención. Además, se conocen en la técnica muchos promotores diferentes adecuados para su uso en levadura. Además, pueden introducirse secuencias ligadoras intermedias cortas (por ejemplo, péptidos de 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácido) entre partes de una proteína de fusión que comprenden un antígeno de MUC1 por una variedad de motivos, incluyendo la introducción de sitios de enzima de restricción para facilitar la clonación, como sitios de escisión para proteasas fagosómicas del huésped, para acelerar el procesamiento de proteínas o antígenos, y para la manipulación futura de los constructos.

Para su uso en realizaciones de la invención referidas a levadura, puede usarse cualquier promotor de levadura adecuado y los expertos en la técnica conocen una variedad de tales promotores. Los promotores para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, pero no se limitan a, promotores de genes que codifican para las siguientes proteínas de levadura: alcohol deshidrogenasa I (ADH1) o II (ADH2), CUP1, fosfoglicerato cinasa (PGK), triosa fosfato isomerasa (TPI), factor de elongación traduccional EF-1 alfa (TEF2), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; también denominada TDH3, para triosa fosfato deshidrogenasa), galactocinasa (GAL1), galactosa-1-fosfato uridil-transferasa (GAL7), UDP-galactosa epimerasa (GAL10), citocromo c1 (CYC1), proteína Sec7 (SEC7) y fosfatasa ácida (PHO5), incluyendo promotores híbridos tales como los promotores *ADH2/GAPDH* y *CYC1/GAL10*, e incluyendo el promotor *ADH2/GAPDH*, que se induce cuando las concentraciones de glucosa en la célula son bajas (por ejemplo, aproximadamente del 0,1 a aproximadamente el 0,2 por ciento), así como el promotor *CUP1* y el promotor *TEF2*. Asimismo, se conocen varias secuencias de activación anteriores (UAS), también denominadas potenciadores. Las secuencias de activación anteriores para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, pero no se limitan a, las UAS de genes que codifican para las siguientes proteínas: PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 y GAL10, así como otras UAS activadas por el producto génico de GAL4, usándose la UAS de ADH2 en un aspecto. Puesto que la UAS de ADH2 se activa por el producto génico de ADR1, puede ser preferible sobreexpresar el gen de ADR1 cuando un gen heterólogo se une operativamente a la UAS de ADH2. Las secuencias de terminación de la transcripción para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen las secuencias de terminación de los genes de factor α , GAPDH y CYC1.

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

Según la presente invención, un "vehículo de levadura" usado en una composición para inmunoterapia basada en levadura es cualquier célula de levadura (por ejemplo, una célula completa o intacta) o un derivado de la misma (véase a continuación) que puede usarse junto con uno o más antígenos, dominios inmunogénicos de los mismos, o epítopos de los mismos en una composición inmunoterápica basada en levadura de la invención (por ejemplo, una composición terapéutica o profiláctica). Por tanto, el vehículo de levadura puede incluir, pero no se limita a, un microorganismo de levadura intacta (completa) vivo (es decir, una célula de levadura que tiene todos sus componentes incluyendo una pared celular), un microorganismo de levadura intacta destruido (muerto) o inactivado, derivados de levadura intacta incluyendo un esferoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de pared celular), un citoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de pared celular y núcleo), un fantasma de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de pared celular, núcleo y citoplasma), un extracto subcelular de membrana de levadura o fracción del mismo (también denominado partícula de membrana de levadura y previamente como partícula de levadura subcelular), cualquier otra partícula de levadura, o una preparación de pared de célula de levadura.

Los esferoplastos de levadura se producen normalmente mediante digestión enzimática de la pared de célula de levadura. Se describe un método de este tipo, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, *Met. Enzymol.*, 194: 662-674 (1991). Los citoplastos de levadura se producen normalmente mediante enucleación de células de levadura. Se describe un método de este tipo, por ejemplo, en Coon, *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 48: 45-55 (1978). Los fantasmas de levadura se producen normalmente mediante el resellado de una célula permeabilizada o lisada y pueden contener, pero no es necesario, al menos algunos de los orgánulos de esa célula. Se describe un método de este tipo, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 258, 3608-3614 (1983) y Bussey *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 553: 185-196 (1979). Una partícula de membrana de levadura (extracto subcelular de membrana de levadura o fracción del mismo) se refiere a una membrana de levadura que carece de citoplasma o núcleo natural. La partícula puede ser de cualquier tamaño, incluyendo tamaños que oscilan entre el tamaño de una membrana de levadura natural y micropartículas producidas mediante sonicación u otros métodos de rotura de membrana que conocen los expertos en la técnica, seguido por resellado. Se describe un método para producir extractos subcelulares de membrana de levadura, por ejemplo, en Franzusoff *et al.*, *Met. Enzymol.*, 194, 662-674 (1991). También pueden usarse fracciones de partículas de membrana de levadura que contienen partes de membrana de levadura y, cuando el antígeno u otra proteína se expresa de manera recombinante por la levadura antes de la preparación de las partículas de membrana de levadura, el antígeno u otra proteína de interés. Pueden portarse antígenos u otras proteínas de interés en el interior de la membrana, o bien sobre la superficie de la membrana, o combinaciones de los mismos (es decir, la proteína puede estar tanto en el interior como en el exterior de la membrana y/o abarcar la membrana de la partícula

de membrana de levadura). En una realización, una partícula de membrana de levadura es una partícula de membrana de levadura recombinante que puede ser una membrana de levadura intacta, rota, o rota y resellada que incluye al menos un antígeno deseado u otra proteína de interés en la superficie de la membrana o integrada al menos parcialmente dentro de la membrana. Un ejemplo de una preparación de pared de célula de levadura es una preparación de paredes de célula de levadura aisladas que portan un antígeno en su superficie o al menos parcialmente integrado dentro de la pared celular de tal manera que la preparación de pared de célula de levadura, cuando se administra a un sujeto, estimula una respuesta inmunitaria deseada frente a una diana patológica.

Cualquier cepa de levadura puede usarse para producir un vehículo de levadura de la presente invención, o usarse de otro modo como célula huésped en la presente invención. Las levaduras son microorganismos unicelulares que pertenecen a una de tres clases: ascomicetos, basidiomicetos y hongos imperfectos. Una consideración para la selección de un tipo de levadura para su uso como modulador inmunitario es la patogenicidad de la levadura. En una realización, la levadura es una cepa no patogénica tal como *Saccharomyces cerevisiae*. La selección de una cepa de levadura no patogénica minimiza cualquier efecto adverso al individuo al que se le administra el vehículo de levadura. Sin embargo, puede usarse levadura patogénica si la patogenicidad de la levadura puede anularse mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, cepas mutantes). Según un aspecto de la presente invención, se usan cepas de levadura no patogénicas.

Los géneros de cepas de levadura que pueden usarse en la invención incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces*, *Candida* (que puede ser patogénica), *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Yarrowia*. En un aspecto, los géneros de levadura se seleccionan de *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* o *Schizosaccharomyces*, y en un aspecto, se usa *Saccharomyces*. Las especies de cepas de levadura que pueden usarse en la invención incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida kefir*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Yarrowia lipolytica*. Ha de apreciarse que varias de estas especies incluyen una variedad de subespecies, tipos, subtipos, etc. que se pretende que estén incluidos dentro de las especies mencionadas anteriormente. En un aspecto, las especies de levadura usadas en la invención incluyen *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* y *S. pombe*. *S. cerevisiae* es útil ya que es relativamente fácil de manipular y "generalmente reconocida como segura" o "GRAS" para su uso como aditivos alimentarios (GRAS, regla 62FR18938 propuesta por la FDA, 17 de abril de 1997). Una realización de la presente invención es una cepa de levadura que puede replicar plásmidos hasta un número de copias particularmente alto, tal como una cepa de *S. cerevisiae* cir°. La cepa de *S. cerevisiae* es una cepa tal que puede soportar vectores de expresión que permiten que se expresen una o más diana(s) antigénica(s) y/o proteína(s) de fusión de antígeno y/u otras proteínas a altos niveles. Otra cepa de levadura que es útil en la invención es *Saccharomyces cerevisiae* W303α. Además, puede usarse cualquier cepa de levadura mutante en la presente invención, incluyendo las que presentan modificaciones postraduccionales reducidas de expresadas antígeno dianas u otras proteínas, tales como mutaciones en las enzimas que extienden la glicosilación unida a N. En un aspecto de la invención, se produce una composición para inmunoterapia basada en levadura es usando una cepa de levadura mutante que produce el antígeno de MUC1 como proteína subglicosilada en comparación con el mismo antígeno producido por la cepa de tipo natural (con glicosilación normal). Tal antígeno de MUC1 puede ser más similar a antígenos de MUC1 expresados por células tumorales, que pueden procesarse entonces en epítomos únicos de células T por células presentadoras de antígeno, potenciando por tanto la respuesta antitumoral específica.

En general, el vehículo de levadura y antígeno(s) y/u otros agentes pueden asociarse mediante cualquier técnica descrita en el presente documento. En un aspecto, el vehículo de levadura se carga de manera intracelular con el/los antígeno(s) y/u otros agente(s) o agente(s) adicional(es) que van a incluirse en la composición. En otro aspecto, el/los antígeno(s) y/o agente(s) se une(n) de manera covalente o de manera no covalente al vehículo de levadura. En aún otro aspecto, el vehículo de levadura y el/los antígeno(s) y/o agente(s) se asocian mediante mezclado. En otro aspecto, el/los antígeno(s) y/o agente(s) se expresan de manera recombinante por el vehículo de levadura o por la célula de levadura o esferoplasto de levadura del que se deriva el vehículo de levadura (si el vehículo de levadura es distinto de una célula intacta completa o un esferoplasto).

En una realización, una célula de levadura usada para preparar el vehículo de levadura se transfecta con una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica para un péptido (por ejemplo, el antígeno) de tal manera que el péptido se exprese por la célula de levadura. Tal levadura también se denomina en el presente documento levadura recombinante o un vehículo de levadura recombinante. La célula de levadura puede formularse entonces con un excipiente farmacéuticamente aceptable y se administra directamente a un individuo, se almacena para su administración posterior a un individuo, o se carga en una célula dendrítica, que entonces puede administrarse a su vez a un individuo. La célula de levadura también puede destruirse, o puede derivatizarse tal como mediante la formación de esferoplastos, citoplastos, fantasmas o partículas subcelulares de levadura, cualquiera de los cuales puede estar seguido por almacenar, administrar directamente a un individuo, o cargar la célula o derivado en una célula dendrítica. Los esferoplastos de levadura también pueden transfectarse directamente con una molécula de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, se produce el esferoplasto a partir de una levadura completa, y luego se transfecta) para producir un esferoplasto recombinante que expresa el antígeno. Pueden usarse células de levadura

o esferoplastos de levadura que expresan de manera recombinante el/los antígeno(s) para producir un vehículo de levadura que comprende una citoplasto de levadura, un fantasma de levadura, o una partícula de membrana de levadura o partícula de pared de célula de levadura, o fracción de los mismos.

5 El número de antígenos y/u otras proteínas que van a producirse por un vehículo de levadura de la presente invención es cualquier número de antígenos y/u otras proteínas que puedan producirse razonablemente por un vehículo de levadura, y normalmente oscila entre al menos uno y al menos aproximadamente 6 o más, incluyendo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6 antígenos y/u otras proteínas.

10 Se logra la expresión de un antígeno u otras proteínas en un vehículo de levadura de la presente invención usando técnicas que conocen los expertos en la técnica. En resumen, se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica para al menos un antígeno deseado u otra proteína en un vector de expresión de tal manera que la molécula de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia de control de la transcripción para poder efectuar la expresión o bien constitutiva o bien regulada de la molécula de ácido nucleico cuando se transforma en una célula huésped de levadura. Las moléculas de ácido nucleico que codifican para uno o más antígenos y/u otras proteínas pueden estar en uno o más vectores de expresión operativamente unidos a una o más secuencias de control de la expresión. Secuencias de control de la expresión particularmente importantes son aquellas que controlan la iniciación de la transcripción, tales como secuencias de activación promotoras y anteriores. Se han descrito anteriormente promotores adecuados para su uso en levadura.

20 La transfección de una molécula de ácido nucleico en una célula (por ejemplo, célula de levadura) según la presente invención puede lograrse mediante cualquier método mediante el que puede introducirse una molécula de ácido nucleico en la célula e incluye, pero no se limita a, difusión, transporte activo, sonicación en baño, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión de protoplastos. Pueden integrarse moléculas de ácido nucleico transfectadas, en un cromosoma de levadura o mantenerse en vectores extracromosómicos usando técnicas que conocen los expertos en la técnica. Se dan a conocer ejemplos de vehículos de levadura que portan tales moléculas de ácido nucleico con detalle en el presente documento. Tal como se comentó anteriormente, también pueden producirse citoplasto de levadura, fantasma de levadura y partículas de membrana de levadura o preparaciones de pared celular de manera recombinante transfectando microorganismos de levadura intacta o esferoplastos de levadura con moléculas de ácido nucleico deseadas, produciendo el antígeno en los mismos, y luego manipulando adicionalmente los microorganismos o esferoplastos usando técnicas que conocen los expertos en la técnica para producir citoplasto, fantasma o extracto subcelular de membrana de levadura o fracciones de los mismos que contienen antígenos deseados u otras proteínas.

35 Las condiciones eficaces para la producción de vehículos de levadura recombinantes y expresión del antígeno y/u otra proteína por el vehículo de levadura incluyen un medio eficaz en el que puede cultivarse una cepa de levadura. Un medio eficaz es normalmente un medio acuoso que comprende fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y fosfato, así como sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas y factores de crecimiento. El medio puede comprender nutrientes complejos o puede ser un medio mínimo definido. Pueden cultivarse cepas de levadura de la presente invención en una variedad de recipientes, incluyendo, pero sin limitarse a, biorreactores, matraces Erlenmeyer, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. Se lleva a cabo el cultivo a una temperatura, un pH y contenido de oxígeno apropiados para la cepa de levadura. Tales condiciones de cultivo están bastante dentro de la experiencia de un experto habitual en la técnica (véase, por ejemplo, Guthrie *et al.* (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego (1991)). Por ejemplo, en un protocolo, pueden inocularse cultivos líquidos que contienen un medio adecuado usando cultivos obtenidos a partir de placas iniciadoras y/o cultivos iniciadores de composiciones para inmunoterapia basadas en MUC1-levadura, y se hacen crecer durante aproximadamente 20 h a 30°C, con agitación a 250 rpm. Entonces pueden expandirse los cultivos primarios para dar cultivos más grandes según se desee. La expresión de proteína a partir de vectores con los que se transformaron las levaduras (por ejemplo, expresión de MUC1) puede ser constitutiva si el promotor utilizado es un promotor constitutivo, o puede inducirse mediante la adición de las condiciones de inducción apropiadas para el promotor si el promotor utilizado es un promotor inducible (por ejemplo, sulfato de cobre en el caso del promotor CUP1). En el caso de un promotor inducible, puede iniciarse la inducción de la expresión de proteína después de haberse hecho crecer el cultivo hasta una densidad celular adecuada, que puede estar en aproximadamente 0,2 YU/ml o mayores densidades.

55 Un ejemplo no limitativo de un medio adecuado para el cultivo de una composición para inmunoterapia basada en levadura de la invención es el medio U2. El U2 medio comprende los siguientes componentes: 15 g/l de glucosa, 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura que contiene sulfato de amonio, y 0,04 mg/ml de cada uno de histidina, triptófano y adenina, y 0,06 mg/ml de leucina. Otro ejemplo no limitativo de un medio adecuado para el cultivo de composición para inmunoterapia basada en levadura de la invención es el medio UL2. El medio UL2 comprende los siguientes componentes: 15 g/l de glucosa, 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura que contiene sulfato de amonio, y 0,04 mg/ml de cada uno de histidina, triptófano y adenina.

65 En algunas realizaciones de la invención, las levaduras se hacen crecer en condiciones de pH neutro (a veces también denominadas condiciones "DEC" o "Dec"). Tal como se usa en el presente documento, el uso general del término "pH neutro" se refiere a un intervalo de pH de entre aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 8, y en

un aspecto, entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente 8. Un experto en la técnica apreciará que pueden producirse fluctuaciones menores (por ejemplo, de décimas o centésimas) cuando se mide con un pHmetro. Como tal, el uso de pH neutro para hacer crecer células de levadura significa que se hacen crecer las células de levadura en pH neutro durante la mayoría del tiempo que están en cultivo. En una realización, se hacen crecer levaduras en un medio mantenido a un nivel de pH de al menos 5,5 (es decir, no se permite que el pH del medio de cultivo disminuya por debajo de pH 5,5). En otro aspecto, se hacen crecer levaduras a un nivel de pH mantenido a aproximadamente 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. En un aspecto, se mantiene el pH neutro usando un tampón adecuado para crear un medio de crecimiento o cultivo tamponado. El uso de un pH neutro en levadura en cultivo fomenta varios efectos biológicos que son características deseadas para usar la levadura como vehículos para inmunomodulación. Por ejemplo, el cultivo de la levadura en pH neutro permite un buen crecimiento de la levadura sin efecto negativo sobre el tiempo de generación de células (por ejemplo, ralentización del tiempo de duplicación). Puede continuar haciéndose crecer la levadura hasta altas densidades sin perder su flexibilidad de pared celular. El uso de un pH neutro permite la producción de levaduras con paredes celulares flexibles y/o levaduras que son más sensibles a las enzimas de digestión de pared celular (por ejemplo, glucanasa) a todas las densidades de recogida. Este rasgo es deseable porque las levaduras con paredes celulares flexibles pueden inducir respuestas inmunitarias diferentes o mejoradas en comparación con levaduras hechas crecer en condiciones más ácidas, por ejemplo, fomentando la secreción de citocinas por células presentadoras de antígeno que han fagocitado la levadura (por ejemplo, citocinas de tipo TH1 incluyendo, pero sin limitarse a, IFN- γ , interleucina-12 (IL-12) e IL-2, así como citocinas proinflamatorias tales como IL-6). Además, se proporciona una accesibilidad a los antígenos ubicados en la pared celular mediante tales métodos de cultivo. En otro aspecto, el uso de pH neutro para algunos antígenos permite la liberación de antígeno unido con enlaces disulfuro mediante tratamiento con ditioneítrito (DTT) lo que no es posible cuando se cultiva tal levadura que expresa antígeno en medios a menor pH (por ejemplo, pH 5). En un ejemplo no limitativo del uso de condiciones de pH neutro para cultivar levaduras para su uso en la presente invención, el medio UL2 descrito anteriormente se tampona usando, por ejemplo, 4,2 g/l de Bis-Tris.

En una realización, se usa el control de la cantidad de glicosilación de levadura para controlar la expresión de antígenos por la levadura, particularmente en la superficie. La cantidad de glicosilación de levadura puede afectar a la inmunogenicidad y antigenicidad del antígeno, particularmente uno expresado en la superficie, puesto que los restos de azúcar tienden a ser voluminosos. Como tal, la existencia de los restos de azúcar en la superficie de la levadura y su impacto en el espacio tridimensional alrededor del/de los antígeno(s) diana debe considerarse en la modulación de levadura según la invención. Puede usarse cualquier método para reducir o aumentar la cantidad de glicosilación de la levadura, si se desea. Por ejemplo, podría usarse una cepa mutante de levadura que se ha seleccionado para que tenga baja glicosilación (por ejemplo, mutantes *mnn1*, *och1* y *mnn9*), o podría eliminarse mediante mutación de las secuenciasceptoras de glicosilación en el antígeno diana. Alternativamente, podrían usarse levaduras con patrones de glicosilación abreviados, por ejemplo, *Pichia*. También puede tratarse la levadura usando métodos que reducen o alteran la glicosilación.

En una realización de la presente invención, como alternativa a la expresión de un antígeno de manera recombinante en el vehículo de levadura, se carga un vehículo de levadura de manera intracelular con el péptido y/u otras moléculas que sirven como antígeno y/o son útiles como agentes inmunomoduladores o modificadores de la respuesta biológica según la invención. Posteriormente, el vehículo de levadura, que contiene ahora el antígeno y/u otras proteínas de manera intracelular, puede administrarse a un individuo o, alternativamente, cargarse en un portador tal como una célula dendrítica, que puede administrarse a su vez a un individuo. Pueden insertarse péptidos y proteínas directamente en vehículos de levadura de la presente invención mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tal como mediante difusión, transporte activo, fusión de liposomas, electroporación, fagocitosis, ciclos de congelación-descongelación y sonicación en baño. Los vehículos de levadura que pueden cargarse directamente con péptidos, proteínas, hidratos de carbono, u otras moléculas incluyen levaduras intactas, así como esferoplastos, fantasmas o citoplastos, que pueden cargarse con antígenos y otros agentes después de su producción. Alternativamente, pueden cargarse levaduras intactas con el antígeno y/o agente, y luego pueden prepararse a partir de las mismas esferoplastos, fantasmas, citoplastos o partículas subcelulares. Puede cargarse cualquier número de antígenos y/u otros agentes en un vehículo de levadura en esta realización, desde al menos 1, 2, 3, 4 o cualquier número entero hasta cientos o miles de antígenos y/u otros agentes, tal como se proporcionaría mediante la carga de un microorganismo o partes del mismo, por ejemplo.

En otra realización de la presente invención, un antígeno y/u otro agente se une físicamente al vehículo de levadura. La unión física del antígeno y/u otro agente al vehículo de levadura puede lograrse mediante cualquier método adecuado en la técnica, incluyendo métodos de asociación covalente y no covalente que incluyen, pero no se limitan a, reticular químicamente el antígeno y/u otro agente a la superficie exterior del vehículo de levadura o unir biológicamente el antígeno y/u otro agente a la superficie exterior del vehículo de levadura, tal como usando un anticuerpo u otra pareja de unión. La reticulación química puede lograrse, por ejemplo, mediante métodos que incluyen unión a glutaraldehído, marcaje de fotoafinidad, tratamiento con carbodiimidias, tratamiento con productos químicos que pueden unirse por enlaces disulfuro, y tratamiento con otros productos químicos de reticulación convencionales en la técnica. Alternativamente, puede ponerse en contacto un producto químico con el vehículo de levadura que altera la carga de la bicapa lipídica de la membrana de levadura o la composición de la pared celular de modo que es más probable que la superficie exterior de la levadura se fusione o se una a antígenos y/u otro agente que tiene características de carga particulares. También pueden incorporarse agentes de direccionamiento

tales como anticuerpos, péptidos de unión, receptores solubles y otros ligandos en un antígeno como proteína de fusión o asociarse de otro modo con un antígeno para la unión del antígeno al vehículo de levadura.

5 Cuando el antígeno u otra proteína se expresa en o se une físicamente a la superficie de la levadura, pueden seleccionarse cuidadosamente, en un aspecto, brazos espaciadores para optimizar la expresión o el contenido de antígeno u otra proteína en la superficie. El tamaño del/de los brazo(s) espaciador(es) puede afectar a qué cantidad del antígeno u otra proteína queda expuesta para la unión en la superficie de la levadura. Por tanto, dependiendo de qué antígeno(s) u otra(s) proteína(s) esté(n) usándose, un experto en la técnica seleccionará un brazo espaciador que efectúa un espaciado apropiado para el antígeno u otra proteína en la superficie de la levadura. En una
10 realización, el brazo espaciador es una proteína de levadura de al menos 450 aminoácidos. Se han analizado brazos espaciadores con detalle anteriormente.

En aún otra realización, el vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína se asocian entre sí mediante un mecanismo más pasivo, inespecífico o de unión no covalente, tal como mezclando suavemente el vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína entre sí en un tampón u otra formulación adecuada (por ejemplo, mezcla).
15

En una realización, puede molerse levadura intacta (con o sin expresión de antígenos heterólogos u otras proteínas) o procesarse de manera que se produzcan preparaciones de pared de célula de levadura, partículas de membrana de levadura o fragmentos de levadura (es decir, no intacta) y los fragmentos de levadura pueden dotarse, en algunas realizaciones, de o administrarse con otras composiciones que incluyen antígenos (por ejemplo, vacunas de ADN, vacunas de subunidades de proteína, patógenos muertos o inactivados, vacunas de vectores virales) para potenciar respuestas inmunitarias. Por ejemplo, puede usarse tratamiento enzimático, tratamiento químico o fuerza física (por ejemplo, cizallamiento mecánico o sonicación) para romper la levadura en partes que se usan como adyuvante.
20

En una realización de la invención, los vehículos de levadura útiles en la invención incluyen vehículos de levadura que se han destruido o inactivado. La destrucción o inactivación de levaduras puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inactivación por calor de levaduras es un modo convencional de inactivar levaduras, y un experto en la técnica puede monitorizar los cambios estructurales del antígeno diana, si se desea, mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. Alternativamente, pueden usarse otros métodos de inactivación de levaduras, tal como métodos químicos, eléctricos, radiactivos o de UV. Véase, por ejemplo, la metodología dada a conocer en libros de texto sobre cultivo de levaduras convencionales tales como *Methods of Enzymology*, Vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing (1990). Cualquiera de las estrategias de inactivación usadas debe tener en cuenta la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del antígeno diana y preservar tal estructura para optimizar su inmunogenicidad.
25
30
35

Pueden formularse vehículos de levadura en composiciones o productos para inmunoterapia basados en levadura de la presente invención usando varias técnicas que conocen los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden secarse vehículos de levadura mediante liofilización. También pueden prepararse formulaciones que comprenden vehículos de levadura empaquetando levaduras en una torta o un comprimido, tal como se realiza para la levadura usada en operaciones de panificación o elaboración de cerveza. Además, pueden mezclarse vehículos de levadura con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tampón isotónico que tolera un huésped o una célula huésped. Los ejemplos de tales excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, disolución de dextrosa, solución de Hank, y otras disoluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas. También pueden usarse vehículos no acuosos, tales como aceites fijos, aceite de sésamo, oleato de etilo o triglicéridos. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, glicerol o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades minoritarias de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, m u o-cresol, formalina y alcohol bencílico. Las formulaciones convencionales pueden ser o bien preparaciones inyectables líquidas o bien sólidas que pueden llevarse a un líquido adecuado como suspensión o disolución para inyección. Por tanto, en una formulación no líquida, el excipiente puede comprender, por ejemplo, dextrosa, albúmina sérica humana, y/o conservantes a los que puede añadirse agua estéril o solución salina antes de la administración.
40
45
50

El péptido, ácido nucleico, vector o la célula puede aislarse. El término "aislado" tal como se usa en el presente documento abarca compuestos o composiciones que se han retirado de un entorno biológico (por ejemplo, una célula, un tejido, medio de cultivo, líquido corporal, etc.) o se ha aumentado de otro modo su pureza en cualquier grado (por ejemplo, aislado de un medio de síntesis). Las composiciones y los compuestos aislados pueden ser, por tanto, sintéticos o producirse de manera natural.
55
60

El péptido, ácido nucleico, vector o la célula puede formularse como una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende el péptido, ácido nucleico, vector o la célula y un portador (por ejemplo, un portador farmacéutico o fisiológicamente aceptable). Además, el péptido, ácido nucleico, vector, la célula o composición de la invención puede usarse en los métodos descritos en el presente documento solos o como parte de una formulación farmacéutica.
65

La composición (por ejemplo, composición farmacéutica) puede comprender más de un péptido, ácido nucleico, vector o una célula o composición de la invención. Los vectores y las composiciones de la invención pueden incluir además o pueden administrarse con (de manera concurrente, de manera secuencial o de manera intermitente con) cualquier otro agente o composición o protocolo que sea útil para prevenir o tratar cáncer o cualquier compuesto que trate o mejore cualquier síntoma de cáncer, y particularmente cánceres asociados con la expresión o sobreexpresión de MUC1. Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más de otros fármacos o agentes farmacéuticamente activos. Los ejemplos de tales otros fármacos o agentes farmacéuticamente activos que pueden ser adecuados para su uso en la composición farmacéutica incluyen agentes anticancerígenos (por ejemplo, agentes quimioterápicos o radioterápicos), antimetabolitos, hormonas, antagonistas de hormonas, antibióticos, fármacos antivirales, fármacos antifúngicos, ciclofosfamida, y combinaciones de los mismos. Los agentes anticancerígenos adecuados incluyen, sin limitación, agentes de alquilación, antagonistas de folato, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, venenos del huso, inhibidores de topoisomerasa, agentes inductores de apoptosis, inhibidores de la angiogénesis, podofilotoxinas, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, interferón, asparaginasa, tamoxifeno, leuprolida, flutamida, megestrol, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, irinotecán, Taxol, geldanamida (por ejemplo, 17-AAG), y diversos péptidos y anticuerpos anticancerígenos conocidos en la técnica.

Los agentes de alquilación a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, mostazas de nitrógeno (por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, mostaza de uracilo o clorambucilo), alquilsulfonatos (por ejemplo, busulfano), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina, semustina, estreptoizocina o dacarbazina). Los antimetabolitos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, análogos de ácido fólico (por ejemplo, metotrexato), análogos de pirimidina (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU) o citarabina) y análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina o tioguanina). Las hormonas y antagonistas de hormonas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, adrenocorticosteroides (por ejemplo, prednisona), progestágenos (por ejemplo, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de magesrol), estrógenos (por ejemplo, dietilestilbestrol y etinilestradiol), antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno) y andrógenos (por ejemplo, propionato de testosterona y fluoximesterona). Otros agentes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina o vindesina), epipodofilotoxinas (por ejemplo, etopósido o tenipósido), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina o mitomicina C), enzimas (por ejemplo, L-asparaginasa), complejo de coordinación de platino (por ejemplo, cis-diamina-dicloroplatino II también conocido como cisplatino), ureas sustituidas (por ejemplo, hidroxiaurea), derivados de metilhidrazina (por ejemplo, procarbazona) y supresores corticosuprarrenales (por ejemplo, mitotano y aminoglutetimida).

Los agentes quimioterápicos que pueden administrarse de manera concurrente, de manera secuencial o de manera intermitente con las composiciones y los vectores dados a conocer en el presente documento incluyen Adriamycin, Alkeran, Ara-C, busulfano, CCNU, carboplatino, cisplatino, Cytoxan, daunorubicina, DTIC, 5-FU, fludarabina, Hydrea, idarubicina, ifosfamida, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza de nitrógeno, Taxol (u otros taxanos, tales como docetaxel), Velban, vincristina, VP-16, gemcitabina (Gemzar), Herceptin, irinotecán (Camptosar, CPT-11), Leustatin, Navelbine, Rituxan STI-571, Taxotere, topotecán (Hycamtin), Xeloda (capecitabina), Zevelin, enzalutamida (MDV-3100 o XTANDI™) y calcitriol. Los inmunomoduladores y/o citocinas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; Genetics Institute), IL-2 (Cetus o Hoffman-LaRoche), globulina inmunitaria humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg de New Orleans, La.), SK&F 106528, factor de necrosis tumoral (TNF)- α y TNF- β .

Otros agentes, composiciones o protocolos (por ejemplo, protocolos terapéuticos) que son útiles para el tratamiento de cáncer junto con los péptidos, ácidos nucleicos, vectores, células y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, extirpación quirúrgica de un tumor, radioterapia, trasplante alogénico o autólogo de células madre, transferencia adoptiva de células T y/o terapias dirigidas contra el cáncer (por ejemplo, fármacos de molécula pequeña, productos biológicos o terapias con anticuerpos monoclonales que seleccionan como diana específicamente moléculas implicadas en el crecimiento y la progresión tumorales, incluyendo, pero sin limitarse a, moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), inhibidores de aromatasas, inhibidores de tirosina cinasa, inhibidores de serina/treonina cinasa, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), activadores de receptores de retinoides, estimuladores de la apoptosis, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), o inmunostimuladores).

El agente activo adicional (por ejemplo, agente quimioterápico) puede administrarse antes de, de manera concurrente con (incluyendo simultáneamente), de manera alterna con, de manera secuencial, o después de la administración con las composiciones y los vectores dados a conocer en el presente documento. En determinadas realizaciones, se administran uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5) agentes quimioterápicos en combinación con las composiciones y los vectores dados a conocer en el presente documento. Por ejemplo, cuando se administra a un individuo junto con quimioterapia o una terapia dirigida contra el cáncer, puede desearse administrar las composiciones para inmunoterapia basadas en levadura durante el "descanso" entre dosis de quimioterapia o terapia dirigida contra el cáncer, para maximizar la eficacia de las composiciones para inmunoterapia. La extirpación quirúrgica de un tumor puede preceder con frecuencia a la administración de una composición para inmunoterapia basada en levadura, pero puede tener lugar una cirugía adicional o primaria durante o después de la administración

de una composición para inmunoterapia basada en levadura.

El agente activo adicional puede administrarse solo o en una composición. El agente activo adicional puede formularse mediante su inclusión en un vector (por ejemplo, plásmido o vector viral), en liposomas (tecemotide, que también se conoce como STIMUVAX™, vacuna liposomal BLP25 o L-BLP25), o en nanopartículas (por ejemplo, la nanotecnología VERSAMUNE™).

El portador puede ser cualquiera de los usados convencionalmente y está limitado solamente por consideraciones fisicoquímicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el/los compuesto(s) activo(s), y por la vía de administración. Los expertos en la técnica conocen bien portadores farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que es químicamente inerte con respecto al/a los agente(s) activo(s) y uno que no tiene efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

La elección del portador estará determinada en parte por el péptido, ácido nucleico, vector particular, la célula o composición de los mismos de la invención y otros agentes activos o fármacos usados, así como por el método particular usado para administrar el vector o la composición.

La composición puede comprender adicional o alternativamente una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras. Puede usarse cualquier molécula inmunoestimuladora/reguladora adecuada, tal como interleucina (IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, IL-15/IL-15Ra, IL-15/IL-15Ra-Fc, interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α , B7.1, B7.2, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-2, LFA-3, CD70, CD-72, RANTES, G-CSF, GM-CSF, OX-40L, 41 BBL, anticuerpo anti-CTLA-4, inhibidor deIDO, anticuerpo anti-PDL1, anticuerpo anti-PD1, y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la composición comprende una combinación de B7.1, ICAM-1 y LFA-3 (también denominado TRICOM). La una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras pueden administrarse en forma de un vector (por ejemplo, un vector viral recombinante, tal como un vector de poxvirus) que comprende un ácido nucleico que codifica para una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras. Por ejemplo, la una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras (por ejemplo, IL-12) pueden administrarse en forma de un plásmido de ADN con o sin quitosano. Alternativamente, la una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras pueden administrarse como proteína (por ejemplo, proteína recombinante), tal como una proteína (por ejemplo, IL-12 recombinante) a la que se le añadió quitosano. También pueden administrarse una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras en combinación con, o de manera concurrente con, una composición para inmunoterapia basada en levadura de la invención.

En una realización de la invención, la composición comprende un primer vector recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica para el péptido de la invención y el segundo vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica para B7.1, ICAM-1 y LFA-3. En otra realización, el ácido nucleico que codifica para el péptido de la invención y el ácido nucleico que codifica para B7.1, ICAM-1 y LFA-3 están en el mismo vector recombinante. El primer y/o el segundo vectores pueden comprender adicionalmente un ácido nucleico que codifica para otro antígeno asociado a tumor (por ejemplo, CEA), una versión modificada del mismo (por ejemplo, CEA-6D), o un epítipo del mismo.

Por ejemplo, el vector recombinante puede ser un vector de avipox (por ejemplo, virus de viruela del canario o un virus de viruela aviar) que comprende el ácido nucleico que codifica para el péptido de la invención y ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido de B7-1, un polipéptido de ICAM-1 y un polipéptido de LFA-3. Alternativamente, el vector recombinante puede ser un virus ortopox que comprende el ácido nucleico que codifica para el péptido de la invención y ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido de B7-1, un polipéptido de ICAM-1 y un polipéptido de LFA-3.

En otra realización de la invención, la composición comprende una composición para inmunoterapia basada en levadura tal como se describe en el presente documento, en la que la composición para inmunoterapia basada en levadura comprende un vehículo de levadura y al menos un antígeno que comprende el péptido de la invención.

La invención proporciona un método de transducción de células dendríticas con la composición, y opcionalmente moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras, tales como por ejemplo, B7-1, ICAM-1 y LFA-3. En un aspecto de la invención, se administran células dendríticas transducidas con la composición de péptido al huésped para generar una respuesta inmunitaria, tal como la activación de una respuesta de células T citotóxicas.

La invención proporciona una composición, un vector o composiciones inmunoterápicas de MUC1-levadura para su uso en métodos de tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible a un tumor que expresa MUC1 y/o que potencia una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa MUC1 y/o que inhibe un cáncer que expresa MUC-1. En una primera realización, la composición de la invención, un vector o composición inmunoterápica de MUC1-levadura para su uso en estos métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del vector o la composición a un sujeto. El vector o la composición de la invención puede usarse para prevenir el desarrollo de un cáncer que expresa MUC1, particularmente en un individuo que corre un mayor riesgo de

desarrollar tal cáncer que otros individuos, o para tratar un paciente aquejado de un cáncer que expresa MUC1. El vector o la composición de la invención es útil para prevenir la aparición de tales cánceres, detener la progresión de tales cánceres o eliminar tales cánceres. Más particularmente, el vector o la composición de la invención puede usarse para prevenir, inhibir o retrasar el desarrollo de tumores que expresan MUC1, y/o para prevenir, inhibir o retrasar la migración tumoral y/o la invasión tumoral de otros tejidos (metástasis) y/o generalmente para prevenir o inhibir la progresión de cáncer en un individuo. El vector o la composición de la invención también puede usarse para mejorar al menos un síntoma del cáncer, tal como la reducción de la carga tumoral en el individuo; la inhibición del crecimiento tumoral en el individuo; el aumento de la supervivencia del individuo; y/o la prevención, inhibición, reversión o retraso de la progresión del cáncer en el individuo. El vector o la composición de la invención puede usarse para tratar un sujeto con cáncer que expresa MUC1 en cualquier estadio.

En una segunda realización, la composición inmunoterápica de MUC1-levadura de la invención es para su uso en métodos que comprenden tratar células dendríticas obtenidas de un sujeto con la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, y administrar las células dendríticas tratadas al sujeto.

En una tercera realización, la composición inmunoterápica de MUC1-levadura de la invención es para su uso en métodos que comprenden (a) aislar células dendríticas de PBMC obtenidas de un sujeto, (b) tratar las células dendríticas con la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición *ex vivo*, (c) activar las PBMC obtenidas del sujeto con las células dendríticas tratadas *ex vivo*, y (d) administrar las PBMC activadas al sujeto.

En una cuarta realización, la composición inmunoterápica de MUC1-levadura es para su uso en métodos de la invención que comprenden un método para inhibir un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto que comprende (a) aislar células dendríticas de PBMC obtenidas de un sujeto, (b) tratar las células dendríticas con la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición *ex vivo*, (c) activar las PBMC obtenidas del sujeto con las células dendríticas tratadas *ex vivo*, (d) aislar linfocitos T de las PBMC activadas *ex vivo*, y (e) administrar los linfocitos T aislados al sujeto.

La divulgación también proporciona el uso de células T sometidas a transferencia adoptiva estimuladas *in vitro* con uno o más de la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido, polipéptido, ácido nucleico, vector, la célula o composición de los mismos para inhibir un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

El tratamiento (por ejemplo, inhibición de un cáncer que expresa MUC y/o potenciación de una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa MUC1) comprende, pero no se limita a, la destrucción de células tumorales, la reducción de la carga tumoral, la inhibición del crecimiento tumoral, la reducción del tamaño del tumor primario, la reducción del número de lesiones metastásicas, el aumento de la supervivencia del individuo, el retraso, la inhibición, detención o prevención de la aparición o el desarrollo de cáncer metastásico (tal como mediante el retraso, la inhibición, detención o prevención de la aparición o el desarrollo de la migración tumoral y/o la invasión tumoral de tejidos fuera del cáncer primario y/u otros procesos asociados con la progresión metastásica del cáncer), el retraso o la detención de la progresión del cáncer primario, la mejora de respuestas inmunitarias frente al tumor, la mejora de respuestas inmunitarias de memoria a largo plazo frente a los antígenos tumorales, y/o la mejora de la salud general del individuo. Se apreciará que puede producirse la muerte de células tumorales sin una disminución sustancial del tamaño tumoral debido a, por ejemplo, la presencia de células de soporte, vascularización, matrices fibrosas, etc. Por consiguiente, aunque se prefiere la reducción del tamaño tumoral, no se requiere en el tratamiento de cáncer.

El cáncer que expresa MUC1 puede ser cualquier cáncer que expresa MUC1 incluyendo, pero sin limitarse a, carcinomas humanos (tales como de ovario, mama, intestino delgado, estómago, riñón, vejiga, útero, testículo, páncreas, colorrectal, pulmón, tiroides, gástrico, de cabeza y cuello, próstata, esófago, y otros cánceres con origen en células epiteliales), incluyendo cánceres primarios y metastásicos y tumores malignos hematopoyéticos tales como linfomas, leucemias y mielomas (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma mielógeno múltiple (MML), leucemia mieloide aguda (AML), células B transformadas con virus de Epstein-Barr (EBV), linfomas de Burkitt y de Hodgkin y algunos linfomas no Hodgkin de células B).

El vector o la composición puede administrarse al huésped mediante cualquier método. Por ejemplo, el péptido o ácido nucleico que codifica para el péptido (por ejemplo, como vector) puede introducirse en una célula (por ejemplo, en un huésped) mediante cualquiera de diversas técnicas, tales como poniendo en contacto la célula con el péptido, el ácido nucleico, o una composición que comprende el ácido nucleico como parte de un constructo, tal como se describe en el presente documento, lo que permite el suministro y la expresión del ácido nucleico. Se conocen en la técnica protocolos específicos para introducir y expresar ácidos nucleicos en células (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (eds.), citado anteriormente; y Ausubel *et al.*, citado anteriormente).

Una composición para inmunoterapia basada en levadura de la invención puede administrarse mediante diversos métodos aceptables, incluyendo, pero sin limitarse a, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intraganglionar, administración intracoronaria, administración intraarterial (por ejemplo, en una arteria carótida), administración subcutánea, suministro transdérmico, administración intratraqueal, administración intraarticular, administración intraventricular, inhalación (por ejemplo,

aerosol), administración intracraneal, intraespinal, intraocular, auricular, intranasal, oral, pulmonar, impregnación de un catéter e inyección directa en un tejido. En un aspecto, las vías de administración incluyen: intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intraganglionar, intramuscular, transdérmica, inhalada, intranasal, oral, intraocular, intraarticular, intracraneal e intraespinal. El suministro por vía parental puede incluir las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intrapulmonar, intravenosa, subcutánea, por catéter auricular y catéter venoso. El suministro por vía auricular puede incluir gotas óticas, el suministro por vía intranasal puede incluir gotas nasales o inyección intranasal, y el suministro por vía intraocular puede incluir colirios. El suministro en aerosol (inhalación) también puede realizarse usando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 189: 11277-11281 (1992)). En un aspecto, una composición inmunoterápica basada en levadura de la invención se administra por vía subcutánea. En un aspecto, la composición inmunoterápica basada en levadura se administra directamente en un medio tumoral.

Se conocen en la técnica métodos adecuados de administración de vectores o composiciones a huéspedes (sujetos). El huésped (sujeto o individuo) puede ser cualquier huésped adecuado, tal como un mamífero (por ejemplo, un roedor, tal como un ratón, una rata, un hámster o una cobaya, un conejo, gato, perro, cerdo, una cabra, vaca, un caballo, primate o ser humano).

Por ejemplo, el vector (por ejemplo, de poxvirus recombinante) puede administrarse a un huésped mediante la exposición de células tumorales al péptido, ácido nucleico o vector *ex vivo* o mediante inyección del vector en el huésped. El vector (por ejemplo, de poxvirus recombinante) o la composición puede administrarse directamente (por ejemplo, administrarse localmente) mediante inyección directa en la lesión cancerosa o el tumor o mediante aplicación tópica (por ejemplo, con un portador farmacéuticamente aceptable).

El vector o la composición puede administrarse solo o en combinación con adyuvantes, incorporado en liposomas (tal como se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.643.599, 5.464.630, 5.059.421 y 4.885.172), incorporado en nanopartículas (por ejemplo, la nanotecnología VERSAMUNE™), administrado con citocinas, administrado con modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferón, interleucina-2 (IL-2), administrado con factores estimulantes de colonias (CSF, GM-CSF y GCSF), y/o administrado con otros reactivos en la técnica que se sabe que potencian la respuesta inmunitaria.

Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen alumbre, sales de aluminio, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, sílice de aluminio, fosfato de calcio, adyuvante incompleto de Freund, saponinas, tales como QS21 (un adyuvante inmunológico derivado de la corteza del árbol de Sudamérica *Quillaja saponaria Molina*), monofosforil-lípido A (MLP-A) y adyuvante RIBI DETOX™.

Un adyuvante particularmente preferido para su uso en la invención es la citocina GM-CSF. Se ha mostrado que GM-CSF es un adyuvante de vacuna eficaz porque potencia el procesamiento y la presentación de antígeno por células dendríticas. Algunos estudios experimentales y clínicos sugieren que GM-CSF recombinante puede reforzar la inmunidad del huésped dirigida a una variedad de inmunógenos.

Puede administrarse GM-CSF usando un vector viral (por ejemplo, vector de poxvirus) o como proteína aislada en una formulación farmacéutica. Puede administrarse GM-CSF al huésped antes, durante o después de la administración inicial del vector o la composición para potenciar la respuesta inmunitaria específica de antígeno en el huésped. Por ejemplo, puede administrarse proteína GM-CSF recombinante al huésped cada día de la vacunación con el vector o la composición y durante cada uno de los siguientes 3 días (es decir, un total de 4 días). Puede usarse cualquier dosis adecuada de GM-CSF. Por ejemplo, pueden administrarse al día 50-500 µg (por ejemplo, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, y los intervalos entremedias) de GM-CSF recombinante. El GM-CSF puede administrarse mediante cualquier método adecuado (por ejemplo, por vía subcutánea) y, preferiblemente, se administra en o cerca del sitio de vacunación de un huésped con la composición de vector del mismo.

En una realización, el péptido de la invención puede conjugarse con péptidos auxiliares o con moléculas portadoras grandes para potenciar la inmunogenicidad del péptido. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, péptido de virus influenza, toxoide tetánico, epítipo CD4 de toxoide tetánico, exotoxina A de *Pseudomonas*, poli-L-lisina, una cola lipídica, secuencia señal de retículo endoplasmático (ER), y similares.

El péptido de la invención también puede conjugarse con una molécula de inmunoglobulina usando métodos aceptados en la técnica. La molécula de inmunoglobulina puede ser específica para un receptor de superficie presente en células tumorales, pero ausente o en cantidades muy bajas en células normales. La inmunoglobulina también puede ser específica para un tejido específico (por ejemplo, tejido de mama, ovario, colon o próstata). Tal conjugado péptido-inmunoglobulina permite dirigir el péptido a una célula y/o un tejido específico.

El vector o la composición se administra a un huésped (por ejemplo, mamífero, tal como un ser humano) en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria específica de MUC1, preferiblemente una respuesta inmunitaria celular. La eficacia del vector como inmunógeno puede determinarse mediante parámetros *in vivo* o *in vitro* tal como se conoce en la técnica. Estos parámetros incluyen, pero no se limitan a, ensayos de citotoxicidad específicos de antígeno, regresión de tumores que expresan MUC1 o epítipos de MUC1, inhibición de células

cancerosas que expresan MUC1 o epítomos de MUC1, producción de citocinas, y similares.

Puede administrarse cualquier dosis adecuada del vector o la composición a un huésped. La dosis apropiada variará dependiendo de factores tales como la edad del huésped, su peso, altura, sexo, estado médico general, historial médico previo, progresión de la enfermedad y carga tumoral y puede determinarla un médico clínico. Por ejemplo, en una realización de la divulgación, el péptido puede administrarse en una dosis de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg (por ejemplo, de 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, y los intervalos entremedias) mediante vacunación del huésped (por ejemplo, mamífero, tal como un ser humano), y preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg por vacunación. Pueden proporcionarse varias dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más, por ejemplo, a lo largo de un periodo de semanas o meses). En una realización de la divulgación, se proporciona una dosis al mes durante 3 meses.

Cuando el vector es un vector viral, una dosis adecuada puede incluir aproximadamente de 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{12} unidades formadoras de placas (UFP) (por ejemplo, 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , y los intervalos entremedias), aunque puede administrarse una dosis mayor o menor a un huésped. Por ejemplo, pueden administrarse aproximadamente 2×10^8 UFP (por ejemplo, en un volumen de aproximadamente 0,5 ml).

Las células de la divulgación (por ejemplo, células T citotóxicas) pueden administrarse a un huésped en una dosis de entre aproximadamente 1×10^5 y 2×10^{11} células (por ejemplo, 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , y los intervalos entremedias) por infusión. Las células pueden administrarse en, por ejemplo, una a tres infusiones (por ejemplo, una, dos o tres). Además de la administración de las células, puede administrarse al huésped un modificador de la respuesta biológica, tal como interleucina 2 (IL-2). Cuando las células que van a administrarse son células T citotóxicas, la administración de la células T citotóxicas puede estar seguida por la administración del péptido, polipéptido, ácido nucleico, vector o la composición de los mismos con el fin de sensibilizar las células T citotóxicas para expandir adicionalmente el número de células T *in vivo*.

En general, una dosis única adecuada de una composición inmunoterápica basada en levadura de la invención es una dosis que puede proporcionar eficazmente un vehículo de levadura y el antígeno de MUC1 a un tipo dado de célula, tejido o región del cuerpo del paciente en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno frente a uno o más antígenos o epítomos de MUC1, cuando se administran una o más veces a lo largo de un periodo de tiempo adecuado. Por ejemplo, en una realización, una dosis única de una MUC1-levadura de la presente invención es de desde aproximadamente 1×10^5 hasta aproximadamente 5×10^7 equivalentes de célula de levadura por kilogramo de peso corporal del organismo al que está administrándose la composición. Una unidad de levadura (YU, *yeast unit*) son 1×10^7 células de levadura o equivalentes de célula de levadura. En un aspecto, una dosis única de un vehículo de levadura de la presente invención es de desde aproximadamente 0,1 YU (1×10^6 células de levadura o equivalentes de célula de levadura) hasta aproximadamente 100 YU (1×10^9 células) por dosis (es decir, por organismo), incluyendo cualquier dosis intermedia, en incrementos de $0,1 \times 10^6$ células (es decir, $1,1 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$, $1,3 \times 10^6$, etc.). En una realización, una dosis adecuada incluye dosis entre 1 YU y 40 YU y, en un aspecto, entre 10 YU y 40 YU o entre 10 YU y 80 YU. En una realización, las dosis se administran en diferentes sitios en el individuo pero durante el mismo periodo de dosificación. Por ejemplo, puede administrarse una dosis de 40 YU inyectando dosis de 10 YU en cuatro sitios diferentes en el individuo durante un periodo de dosificación. La invención incluye la administración de una cantidad de una composición para inmunoterapia de MUC1-levadura (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 YU o más) en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sitios diferentes o más en un individuo para formar una dosis única.

Cuando las células que van a administrarse son células dendríticas, la cantidad de células dendríticas administradas al sujeto variará dependiendo del estado del sujeto y debe determinarse mediante la consideración de todos los factores apropiados por parte del facultativo. Preferiblemente, se utilizan de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{12} células dendríticas (por ejemplo, aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} o aproximadamente 1×10^{11} incluyendo los intervalos entremedias de cualquiera de los números de células descritos en el presente documento) para seres humanos adultos. Estas cantidades variarán dependiendo de la edad, el peso, la talla, el estado, sexo del sujeto, el tipo de tumor que va a tratarse, la vía de administración, si el tratamiento es regional o sistémico, y otros factores. Los expertos en la técnica deben poder derivar fácilmente dosificaciones y pautas posológicas apropiadas para adaptarse a las circunstancias y necesidades específicas del sujeto.

La invención proporciona un método de generación de linfocitos T citotóxicos específicos de péptido *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* mediante la estimulación de linfocitos con una cantidad eficaz del vector o la composición con una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/o adyuvantes o en una formulación liposomal. Los linfocitos pueden ser linfocitos de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, sangre periférica, tejidos tumorales, ganglios linfáticos y derrames, tales como líquido pleural o líquido ascítico.

Los linfocitos T citotóxicos específicos de péptido de MUC1 son inmunorreactivos con MUC1. Preferiblemente, los linfocitos T citotóxicos inhiben la aparición de células tumorales y cáncer e inhiben el crecimiento, o la destrucción, de células tumorales que expresan MUC1 o epítomos de la misma. Los linfocitos T citotóxicos, además de ser

específicos de antígeno, pueden estar restringidos a CMH de clase I. En una realización, los linfocitos T citotóxicos están restringidos a CMH de clase I, HLA-A24. Los linfocitos T citotóxicos tienen preferiblemente un fenotipo CD8⁺.

5 En una realización, se estimulan linfocitos obtenidos del huésped *ex vivo* con la composición para generar linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos pueden administrarse al huésped para potenciar una respuesta inmunitaria frente al cáncer, inhibiendo de ese modo el cáncer. Por consiguiente, la invención proporciona una composición inmunoterápica de MUC1-levadura para su uso en un método de inhibición de cáncer en un huésped que comprende (a) (a) estimular linfocitos obtenidos de un sujeto con la composición para generar linfocitos T citotóxicos, y (b) administrar los linfocitos T citotóxicos al huésped, en la que se inhibe el cáncer.

10 En otra realización, se estimulan linfocitos dentro del huésped mediante la administración al huésped del vector o la composición para generar linfocitos T citotóxicos, linfocitos T citotóxicos que potencian una respuesta inmunitaria frente al cáncer, inhibiendo de ese modo el cáncer.

15 La invención incluye un protocolo de sensibilización y refuerzo. En particular, en una realización referida a péptidos y vectores de la invención, el protocolo incluye una "sensibilización" inicial con una composición que comprende uno o más vectores recombinantes que codifican para el péptido de la invención y opcionalmente una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumor (por ejemplo, CEA), versiones modificadas de los mismos, y epítopos inmunogénicos de los mismos, seguida por uno o preferiblemente múltiples "refuerzos" con una composición que contiene el péptido de la invención o uno o más vectores de poxvirus que codifican para el péptido de la invención y opcionalmente una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumor (por ejemplo, CEA), versiones modificadas de los mismos, y epítopos inmunogénicos de los mismos.

25 En esta realización, la vacunación de sensibilización inicial puede comprender uno o más vectores. En una realización, se usa un único vector (por ejemplo, vector de poxvirus) para el suministro del péptido de la invención y una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumor (por ejemplo, CEA), versiones modificadas de los mismos, y epítopos inmunogénicos de los mismos. En otra realización, dos o más vectores (por ejemplo, vectores de poxvirus) comprenden la vacunación de sensibilización, que se administra simultáneamente en una única inyección.

30 Las vacunaciones de refuerzo también pueden comprender uno o más vectores (por ejemplo, vectores de poxvirus). En una realización, un único vector se usa para el suministro del péptido de la invención y la una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumor (por ejemplo, CEA), versiones modificadas de los mismos, y epítopos inmunogénicos de los mismos de la vacunación de refuerzo. En otra realización, dos o más vectores comprenden la vacunación de refuerzo, que se administran simultáneamente en una única inyección.

35 Pueden usarse diferentes vectores (por ejemplo, vectores de poxvirus) para proporcionar un protocolo de sensibilización/refuerzo heterólogo usando vectores que portan diferentes conjuntos de moléculas terapéuticas para inoculaciones en diferentes intervalos de tiempo. Por ejemplo, en una combinación de sensibilización/refuerzo heteróloga, se usa una primera composición de vector de ortopox para la sensibilización, y se usa una segunda composición de vector de avipox para el refuerzo.

40 La pauta posológica de los vectores (por ejemplo, vectores de poxvirus) implica normalmente la administración repetida del vector de refuerzo. El vector de refuerzo puede administrarse 1-3 veces (por ejemplo, 1, 2 ó 3 veces) en cualquier periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, cada 2-4 semanas) durante cualquier intervalo de tiempo adecuado (por ejemplo, 6-12 semanas para un total de al menos 5 a 15 vacunaciones de refuerzo). Por ejemplo, la vacunación primaria puede comprender un vector de vaccinia o MVA recombinante seguido por múltiples vacunaciones de refuerzo con un vector de avipox. En una realización particular, el huésped recibe una vacunación con el vector de sensibilización, seguida cada 2 semanas después de eso por el vector de refuerzo para 6 refuerzos, seguido cada 4 semanas después de eso por el vector de refuerzo, y continuando con el vector de refuerzo durante un periodo de tiempo que depende de la progresión de la enfermedad.

45 La presente invención también incluye el suministro (administración, inmunización, vacunación) de una composición inmunoterápica basada en levadura de la invención a un sujeto o individuo. El proceso de administración puede realizarse *ex vivo* o *in vivo*, pero se realiza normalmente *in vivo*. Se han descrito anteriormente vías de administración adecuadas y dosis únicas adecuadas para composiciones inmunoterápicas basadas en levadura. Tras una dosis inicial (original o de sensibilización) de una composición inmunoterápica basada en levadura, se administran "dosis de refuerzo" o "refuerzos" de una composición inmunoterápica basada en levadura, por ejemplo, cuando la respuesta inmunitaria frente al antígeno ha menguado o según sea necesario para proporcionar una respuesta inmunitaria o inducir una respuesta de memoria frente a un antígeno o antígeno(s) particular(es). Las dosis de refuerzo pueden administrarse separadas aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, o mensualmente, quincenalmente, trimestralmente, anualmente, y/o en incrementos de unos pocos o varios años después de la administración original (la dosis de sensibilización), dependiendo del estado del individuo que esté tratándose y el objetivo de la terapia en el momento de la administración (por ejemplo, tratamiento profiláctico, activo, de mantenimiento). En una realización, la pauta posológica es una en la que se administran dosis de

composición inmunoterápica basada en levadura al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces o más a lo largo de un periodo de tiempo de desde semanas, hasta meses, hasta años. En una realización, se administran las dosis semanalmente o quincenalmente o cada tres semanas o mensualmente para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dosis o más, seguidas por dosis semanalmente, quincenalmente, cada tres semanas o mensualmente según sea necesario para lograr el tratamiento deseado preventivo o terapéutico para el cáncer. Pueden administrarse dosis de refuerzo adicionales a intervalos similares o más largos (de meses o años) como terapia de mantenimiento o remisión, si se desea.

La divulgación proporciona además un kit que, en una realización, tiene al menos un primer vector recombinante (por ejemplo, vector de poxvirus) que tiene incorporado en su genoma o parte del mismo un ácido nucleico que codifica para el péptido de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable. El primer vector recombinante (por ejemplo, vectores de poxvirus) también puede comprender uno o más ácidos nucleicos que codifican para una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumor (por ejemplo, CEA), versiones modificadas de los mismos, y epítomos inmunogénicos de los mismos. Además del primer vector recombinante, el kit puede tener un segundo vector recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican para una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumor (por ejemplo, CEA), versiones modificadas de los mismos, y epítomos inmunogénicos de los mismos en un portador farmacéuticamente aceptable. El kit proporciona además recipientes, agujas para inyección e instrucciones sobre cómo usar el kit. En otra realización de la divulgación, el kit proporciona además un adyuvante tal como GM-CSF y/o instrucciones para su uso de un adyuvante disponible comercialmente con los componentes del kit.

La divulgación también incluye un kit que comprende cualquiera de las composiciones inmunoterápicas basadas en levadura descritas en el presente documento, o cualquiera de los componentes individuales de tales composiciones descritas en el presente documento. Los kits pueden incluir reactivos adicionales e instrucciones o indicaciones por escrito para el uso de cualquiera de la composiciones de la invención para prevenir o tratar cáncer asociado con o caracterizado por la expresión o sobreexpresión de MUC1.

Tal como se analizó anteriormente, el vector o la composición puede administrarse a un huésped por diversas vías incluyendo, pero sin limitarse a, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa e intratumoral. Cuando se administran múltiples administraciones, las administraciones pueden ser en uno o más sitios en un huésped y, en el caso de inmunoterapia basada en levadura, puede administrarse una dosis única dividiendo la dosis única en partes iguales para la administración en uno, dos, tres, cuatro sitios o más en el individuo.

La administración del vector o la composición puede ser "profiláctica" o "terapéutica". Cuando se proporciona de manera profiláctica, el vector o la composición se proporciona por adelantado a la formación del tumor, o la detección del desarrollo de tumores que expresan MUC1, con el objetivo de la prevención, inhibición o el retraso del desarrollo de tumores que expresan MUC1; y/o la prevención, inhibición o el retraso de metástasis de tales tumores y/o generalmente la prevención o inhibición de la progresión de cáncer en un individuo, y generalmente para permitir o mejorar la capacidad del sistema inmunitario del huésped para luchar contra un tumor que es susceptible de desarrollar el huésped. Por ejemplo, los huéspedes con susceptibilidad hereditaria de cáncer son un grupo preferido de pacientes tratados con tal inmunización profiláctica. La administración profiláctica del vector o la composición previene, mejora o retrasa el cáncer que expresa MUC1. Cuando se proporciona de manera terapéutica, el vector o la composición se proporciona en o después del diagnóstico del cáncer que expresa MUC1, con el objetivo de mejorar el cáncer, tal como mediante la reducción de la carga tumoral en el individuo; la inhibición del crecimiento tumoral en el individuo; el aumento de la supervivencia del individuo; y/o la prevención, inhibición, reversión o retraso de la progresión del cáncer en el individuo.

Cuando ya se le ha diagnosticado al huésped el cáncer o cáncer metastásico que expresa MUC1, puede administrarse el vector o la composición junto con otros tratamientos terapéuticos tales como quimioterapia, extirpación quirúrgica de un tumor, tratamiento con terapia dirigida contra el cáncer, trasplante alogénico o autólogo de células madre, transferencia adoptiva de células T, otras inmunoterapias y/o radioterapia.

En una realización preferida, la administración del vector o la composición a un huésped da como resultado una célula huésped que expresa el péptido de la invención y opcionalmente una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumor (por ejemplo, CEA), versiones modificadas de los mismos, y epítomos inmunogénicos de los mismos que se coadministraron. El péptido de la invención (es decir, antígeno de MUC1) puede expresarse en la superficie celular de la célula huésped infectada. La una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumor (por ejemplo, CEA), versiones modificadas de los mismos, y epítomos inmunogénicos de los mismos pueden expresarse en la superficie celular o pueden secretarse activamente por la célula huésped. La expresión tanto del antígeno de MUC1 como de la molécula inmunoestimuladora/reguladora proporciona el péptido restringido a CMH necesario a células T específicas y la señal apropiada a las células T para ayudar en el reconocimiento de antígeno y la proliferación o expansión clonal de células T específicas de antígeno. El resultado global es una regulación por incremento del sistema inmunitario. Preferiblemente, la regulación por incremento de la respuesta inmunitaria es un aumento de linfocitos citotóxicos y/o linfocitos T auxiliares específicos de antígeno, que pueden destruir o inhibir el crecimiento de una célula cancerosa (por ejemplo, de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de

tiroides, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de próstata).

Existe una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica para su uso en los métodos de la invención. Las siguientes formulaciones para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal son a modo de ejemplo y no son limitativas en modo alguno. Un experto en la técnica apreciará que se conocen estas vías de administración del vector o la composición de la invención, y, aunque puede usarse más de una vía para administrar un compuesto particular, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

Las formulaciones inyectables se encuentran entre aquellas formulaciones que se prefieren según la presente invención. Los requisitos para portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables los conocen bien los expertos habituales en la técnica (véanse, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Filadelfia, PA, Banker and Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982) y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)).

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. El vector o la composición puede administrarse en un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un líquido o una mezcla de líquidos estéril, incluyendo agua, solución salina, disoluciones acuosas de dextrosa y azúcares relacionados, un alcohol, tal como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico, glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, cetales de glicerol, tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, tales como polietilenglicol 400, un aceite, un ácido graso, un éster o glicérido de ácido graso, o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites, que pueden usarse en formulaciones parenterales, incluyen vaselina, aceites animales, vegetales y sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen de cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de ácido graso de metal alcalino, de amonio y de trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetildialquilamonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, alquil, aril y olefinosulfonatos, alquil, olefino, éter y monoglicérido-sulfatos, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de amina grasa, alcanolamidas de ácido graso y copolímeros de polioxitileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-b-aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

Pueden usarse conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones oscilará normalmente entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácido graso de polietileno-sorbitano, tales como monooleato de sorbitano y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, que se forma mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

Las formulaciones parenterales pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en condiciones de secado por congelación (liofilizadas) que requieren solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Las composiciones inmunoterápicas basadas en levadura de la invención se administran de la manera más normal sin adyuvante u otros portadores y como formulación inyectable de la composición basada en levadura en un simple excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como PBS u otro tampón.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no debe interpretarse que limitan su alcance en modo alguno.

EJEMPLO 1

Este ejemplo describe el análisis de epítomos agonistas de HLA-A24 de MUC1-C.

I. Materiales y métodos

5 *Pacientes* - se usaron PBMC de dos pacientes con cáncer de próstata incluidos en un ensayo clínico descrito previamente de la vacuna de PSA-TRICOM en combinación con ipilimumab (Madan *et al.*, Lancet Oncol., 13: 501-8 (2012)). Una junta de revisión institucional del Centro Clínico de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) había aprobado los procedimientos, y se obtuvo el consentimiento informado según la Declaración de Helsinki.

10 *Péptidos* - Se barrió la secuencia de aminoácidos de MUC1 para detectar coincidencias con motivos consenso para péptidos de unión a HLA-A24. Se usó el algoritmo informático desarrollado por Parker *et al.* para clasificar posibles péptidos de unión a CMH según la disociación en la mitad del tiempo predicha de complejos de péptido/CMH (Parker *et al.*, J. Immunol., 152: 163-75 (1994)). American Peptide Company (Sunnyvale, CA) sintetizó análogos peptídicos de 9 meros y de 10 meros a partir de la región MUC1-C de MUC1 con sustituciones de aminoácido individuales para aumentar la afinidad de unión (tabla 1). La pureza de los péptidos fue >90%.

15 Tabla 1. Péptidos de unión a HLA-A24 de MUC1 y posibles agonistas con unión predicha y ensayo de unión de células T2.

Péptido	Posición	Secuencia [^]	Unión predicha*
C6	462-471	TYHPMSEYPT (SEQ ID NO: 3)	6
C6A		KYHPMSEYAL (SEQ ID NO: 1)	480
C7	502-510	SYTNPAVAA (SEQ ID NO: 4)	5
C7A		KYTNPAVAL (SEQ ID NO: 2)	400

[^]Los aminoácidos que se cambiaron para generar un epítipo agonista están en negrita.
*Unión predicha basándose en el motivo notificado (Parker *et al.*, citado anteriormente); estimación de puntuación de la mitad del tiempo de disociación de una molécula que contiene esta secuencia.

20 *Ensayos de afinidad y avidéz* – A pesar de numerosos intentos para establecer ensayos de unión para péptidos de HLA-A24 usando células T2-A24, no pudieron establecerse ensayos fiables. Por tanto, se evaluaron estos péptidos basándose solamente en la capacidad para lisar células pulsadas con el péptido correspondiente y células tumorales que expresan el péptido nativo.

25 *Establecimiento de líneas de células T* - Se usó una versión modificada del protocolo descrito por Tsang *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 87: 982-90 (1995), para generar CTL específicos de MUC1. Se pulsaron DC autólogas irradiadas, con 20 µg/ml de péptido durante 2 horas, y luego se añadieron PBMC a una razón de 10:1. Después de 3 días, se añadió IL-2 humana (20 unidades Cetus/ml). Se reestimularon las células cada 7 días. Después de la tercera estimulación *in vitro*, se reestimularon las células usando células B transformadas con virus Epstein-Barr autólogas como células presentadoras de antígeno a una razón de 2:1, y se mantuvieron en medio que contenía IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (5 ng/ml).

30 *Detección de citocinas* - Se incubaron células B autólogas pulsadas con péptidos a diferentes concentraciones (25, 12,5, 6,25 y 3, 13 y 1,56 µg/ml) con líneas de células T específicas de MUC1 a una razón de 2:1 durante 24 horas. Se analizaron los sobrenadantes para detectar IFN-γ mediante ELISA (Invitrogen, Frederick, MD).

35 *Cultivos de células tumorales* – Se adquirieron la línea celular de carcinoma de páncreas ASPC-1 (HLA-A3^{neg}, HLA-A24^{neg}, MUC1⁺), la línea celular de cáncer de colon SW620 (HLA-A24⁺, MUC1⁺) y la línea celular de cáncer de próstata PC3 (HLA-A24⁺, MUC1⁺) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Todos los cultivos celulares carecían de micoplasma y se mantuvieron en medio completo (RPMI 1640 complementado con suero de ternera fetal al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM) (Mediatech, Herndon, VA). Se obtuvieron células K562-A2.1 del Dr. C. Britten (Universidad Johannes Gutenberg, Maguncia, Alemania), y se mantuvieron en medio completo complementado con 0,5 mg/ml de G418 (Mediatech, Manassas, VA).

45 *Ensayo de citotoxicidad, inhibición de diana fría y bloqueo de anticuerpos de lisis de células tumorales* - Para determinar la destrucción mediada por células T, se usó un ensayo de liberación de ¹¹¹In durante 16 horas (Tsang *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 87: 982-90 (1995)). Se marcaron 2x10⁶ células diana con 60 µCi de óxido de ¹¹¹In (GE Health Care, Vienna, VA) a 37°C durante 20 minutos, y se usaron a 3000 células/pocillo en placas de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos. Se añadieron células T a diferentes razones. Se realizaron todos los ensayos en medio RPMI sustituido con suero AB humano al 10% (Omega Scientific, Tarzana, CA), glutamina y antibióticos (Mediatech, Manassas, VA). Se determinó la liberación inmediata incubando células diana con medio solo, y se determinó lisis completa incubando con Triton X-100 al 2,5%. Se calculó la lisis usando la fórmula:

55
$$\text{Lisis (\%)} = \frac{\text{liberación observada (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}{\text{liberación completa (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}} \times 100$$

Se realizó un ensayo de inhibición de diana fría añadiendo células K562-A2.1 o K562-A3, con o sin pulsado anterior

con el péptido correspondiente, a una razón de 1:10 a los pocillos (Tsang *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 87: 982-90 (1995)). Se realizó el bloqueo de anticuerpos preincubando células tumorales con 10 µg/ml de anticuerpo anti-HLA-A24 o anticuerpo de control de isotipo (UPC10).

5 II. Análisis

El algoritmo para péptidos de unión a HLA-A24 clase I en la región MUC1-C no reveló agentes de unión a A24 potenciales. Los cambios en los residuos de anclaje revelaron el potencial para tres agonistas de HLA-A24. Se realizaron estudios con dos de estos agonistas (C6A y C7A, tabla 1). El tercer agonista potencial no se describe puesto que una línea de células T generada con este tercer agonista potencial no lisó células tumorales.

Los intentos para generar líneas de células T con el péptido nativo designado como C6 fueron insatisfactorios usando PBMC de dos pacientes con cáncer vacunados diferentes. Sin embargo, podrían generarse líneas de células T a partir de estos mismos pacientes usando APC pulsadas con el péptido agonista correspondiente, C6A (SEQ ID NO: 1).

Se evaluó la línea de células T derivada de APC pulsadas con el péptido C6A para determinar lisis frente a dos líneas de células tumorales MUC1⁺, HLA-A24⁺ diferentes (SW620; cáncer de colon y PC3; cáncer de próstata) y la línea celular de cáncer de páncreas ASPC-1 (MUC1⁺, HLA-A24^{neg}). Se observó la lisis de ambas líneas celulares HLA-A24⁺ (véase la tabla 2) en contraposición a la línea HLA-A24^{neg}.

Tabla 2. Líneas de células T específicas de epítipo agonista y nativo de MUC1 lisan células tumorales que expresan MUC1 nativa y HLA-A24.

Línea de células T	Razón E:T	SW620 MUC1 ⁺ HLAA24 ⁺	PC3 MUC1 ⁺ HLA-A24 ⁺	ASPC-1 MUC1 ⁺ HLAA24 ^{neg}
T-C6	25:1	ND	ND	ND
	12,5:1	ND	ND	ND
T-C6A	25:1	41,2	35,5	2,4
	12,5:1	26,0	22,8	1,9
T-C7	25:1	22,2	ND	0
	12,5:1	13,7	ND	ND
T-C7A	25:1	41,9	22,6	3,4
	12,5:1	32,6	ND	2,1

Los resultados se expresan como lisis espontánea en porcentaje (%). Se realizaron los ensayos a 2 razones de efector (E) con respecto a diana (T, *target*).
ND: no disponible

La línea de células T derivada con el péptido C7 nativo creció escasamente, pero estaban disponibles suficientes células para evaluar esta línea de células T en un ensayo de citotoxicidad usando la línea celular de cáncer de colon SW620. Tal como puede observarse en la tabla 3, la línea de células T derivada con el péptido agonista C7A lisó células SW620 de manera más eficiente que la línea de células T derivada con el péptido C7 nativo. Ninguna línea de células T lisó la línea de células tumorales ASPC-1. La adición de un anticuerpo anti-HLA-A24 redujo enormemente la lisis de células tumorales, demostrando de ese modo la restricción a CMH de la lisis para ambas líneas de células T específicas C6A y C7A (tabla 3).

Tabla 3. Líneas de células T específicas de epítipo agonista de HLA-A24 de MUC1 lisan líneas de células tumorales que expresan MUC1 nativa de manera restringida a HLA.

Línea de células T	Bloqueo	% de lisis de SW620 MUC1 ⁺ HLAA24 ⁺	% de lisis de PC3 MUC1 ⁺ HLA-A24 ⁺
T-C6A	-	41,2	22,8
	Anticuerpo anti-HLA-A24	14,6	10,2
	Control de isotipo	37,0	20,1
T-C7A	-	22,7	22,6
	Anticuerpo anti-HLA-A24	8,6	3,1
	Control de isotipo	17,9	19,7

Los resultados se expresan como % de lisis específica. Se realizaron los ensayos a una razón E:T de 25:1 excepto para la lisis de T-C6A de células PC3, que se realizó a una razón E:T de 12,5:1.

La estimulación de la línea de células T generada con el péptido agonista C6A produjo altos niveles (pg/ml/10⁵ células) de IFN-γ (2.651), GM-CSF (>10.000), IL-8 (>10.000) y TNF-α (372), y bajos niveles (<50) de IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12.

Pudieron generarse líneas de células T del mismo paciente usando APC autólogas pulsadas con los péptidos

agonista C7A o nativo C7. Cada línea celular se estimuló luego durante 24 horas con células B pulsadas o bien con el péptido nativo C7 o bien con el péptido agonista C7A, y se analizaron los niveles de citocinas en el sobrenadante.

5 Tal como se muestra en la tabla 4, la línea de células T generada con el péptido nativo produjo más citocina de tipo I IFN- γ cuando se estimuló con el agonista C7A frente al péptido C7 nativo. Adicionalmente, cuando se estimuló la línea de células T generada con el péptido agonista C7A con tanto péptidos nativos como agonistas, se produjo más IFN- γ , GM-CSF, IL-8, IL-10 y TNF- α mediante estimulación con APC pulsadas con péptido agonista C7A frente al péptido nativo C7 (tabla 4).

10 Tabla 4. Líneas de células T específicas de epítipo agonista de HLA-A24 de MUC1 producen citocinas de tipo I tras la estimulación.

Línea de células T	Péptido	IFN- γ	GM-CSF	IL-2	TNF α	IL-8	IL-6	IL-10
T-C6A	C6A	3060	1277	3630	1021	11,8	7,6	16,4
T-C7	C7	750	237	<2,4	21	6,8	6,4	25
	C7A	1279	300	<2,4	30	7,3	7,7	45
T-C7A	C7	680	215	<2,4	30	112	<2,4	92
	C7A	2000	910	<2,4	70	360	40	375

Los resultados se expresan como pg/ml/2,5x10⁵ células T. Para los experimentos con T-C7 y T-C7A, los niveles de IL-12p70 e IL-1 β fueron <100 pg/ml para los epítipos nativos y agonistas.

15 Los resultados de estos estudios respaldan la utilidad terapéutica de epítipos agonistas de MUC1-C en el contexto de la invención descrita en el presente documento, incluyendo el uso de péptidos solos, en células dendríticas, con formulación de adyuvante clásica o novedosa, o con una gama de adyuvantes biológicos, o citocinas tales como IL-12, GM-CSF o IL-15. Estos péptidos agonistas también pueden usarse para activar células T *in vitro* en enfoques de terapia adoptiva de células T. Los receptores de células T dirigidos contra estos epítipos agonistas también pueden usarse en estudios de transferencia adoptiva de células T modificadas por ingeniería genética. También pueden emplearse péptidos más largos o la propia proteína MUC1 que contiene los epítipos agonistas tal como se describe en el presente documento. Finalmente, pueden emplearse vacunas basadas en vector recombinante, que codifican para el transgén de MUC1 e incluyen las secuencias para estos epítipos agonistas.

25 EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra la producción de una composición inmunoterápica agonista de MUC1 basada en levadura que comprende SEQ ID NO: 1 y conocida como GI-6108.

30 Se modificaron por ingeniería levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) para expresar un antígeno agonista de MUC1 humana bajo el control del promotor inducible de cobre, *CUP1*, produciéndose una composición para inmunoterapia agonista de MUC1-levadura. El antígeno agonista de MUC1 comprende el péptido agonista potenciador de SEQ ID NO: 1, y se diseñó usando un antígeno de MUC1 de tipo natural y de longitud completa que tiene el n.º de registro NP_001191214 (SEQ ID NO: 14) aunque podrían utilizarse otras proteínas MUC1 de tipo natural para diseñar agonistas similares.

35 En resumen, se produjo una proteína de fusión que comprendía un antígeno agonista de MUC1 como un único polipéptido con los siguientes elementos de secuencia fusionados en marco desde el extremo N-terminal al C-terminal, representado por SEQ ID NO: 16: (1) una secuencia líder de factor alfa de SEQ ID NO: 17 (correspondiente a las posiciones 1-89 de SEQ ID NO:16); (2) una secuencia ligadora de Thr-Ser (correspondiente a las posiciones 90-91 de SEQ ID NO: 16); (3) una proteína agonista de MUC1 de longitud completa correspondiente a una proteína de tipo natural excepto por la introducción de 15 sustituciones de aminoácido agonistas y una sustitución inactivante (correspondiente a las posiciones 92-566 de SEQ ID NO: 16) y (4) una cola de histidina hexapeptídica (correspondiente a las posiciones 567-572 de SEQ ID NO: 16). SEQ ID NO: 16 está codificada por la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15 (con codones optimizados para la expresión en levadura). La secuencia líder alfa (correspondiente a las posiciones 1-89 de SEQ ID NO: 16) podría sustituirse por una secuencia N-terminal diferente diseñada para conferir resistencia a la degradación proteasómica y/o estabilizar la expresión, tal como el péptido representado por SEQ ID NO: 19, o un péptido N-terminal de una secuencia líder alfa de levadura diferente tal como SEQ ID NO: 18, o mediante una secuencia señal de MUC1. La cola C-terminal de hexahistidina es opcional, y facilita la identificación y/o purificación de la proteína. En comparación con la proteína MUC1 de tipo natural usada como molde, la secuencia de SEQ ID NO: 16 contiene las siguientes sustituciones de aminoácido: (se facilitan las posiciones de sustitución con referencia a SEQ ID NO: 16 con referencia adicional entre paréntesis a la ubicación de la sustitución en una MUC1 de tipo natural representada por el n.º de registro NP_001191214 identificado como SEQ ID NO: 14): T184L (posición 93 en MUC1 de tipo natural), A232Y (posición 161 en MUC1 de tipo natural), P233L (posición 162 en MUC1 de tipo natural), G240V (posición 169 en MUC1 de tipo natural), S241Y (posición 170 en MUC1 de tipo natural), T242L (posición 171 en MUC1 de tipo natural), A483Y (posición 392 en MUC1 de tipo natural), C495A (posición 404 en MUC1 de tipo natural), C497V (posición 406 en MUC1 de tipo

natural), T513K (posición 422 en MUC1 de tipo natural), P521A (posición 430 en MUC1 de tipo natural), T522L (posición 431 en MUC1 de tipo natural), T535L (posición 444 en MUC1 de tipo natural), D536F (posición 445 en MUC1 de tipo natural) y S551Y (posición 460 en MUC1 de tipo natural). La sustitución C495A (posición 404 en la proteína MUC1 de tipo natural) es la mutación inactivante; el resto de las sustituciones son para producir epítopos agonistas. SEQ ID NO: 16 comprende el péptido agonista potenciador denominado en el presente documento SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 está ubicada en las posiciones 513-522 de SEQ ID NO: 16. La composición para inmunoterapia basada en levadura que comprende la levadura completa *Saccharomyces cerevisiae* que expresa la proteína de fusión de SEQ ID NO: 16 se denomina en el presente documento GI-6108.

Se transfectó un plásmido que contenía antígeno agonista de MUC1 para GI-6108 en la levadura W303 α y se seleccionaron transformantes después de 3 días de crecimiento a 30°C sobre agar de medio mínimo de uridina (UDA, *uridine dropout agar*). Se volvieron a sembrar en franjas colonias individuales sobre placas con agar de medio mínimo de uridina y leucina (ULDA, *uridine and leucine dropout agar*) y se incubaron a 30°C durante 4 días adicionales para seleccionar células con elevado número de copias de plásmido.

Se retiró una única colonia de GI-6108 de la placa con ULDA y se usó para inocular 25 ml de medio líquido UL2 (cultivo iniciador). También se inoculó medio UL2 con pH tamponado que contenía 4,2 g/l de Bis-Tris (BT-UL2) con GI-6108 para evaluar este producto inmunoterápico basado en levadura producido en las condiciones de fabricación a pH neutro (la levadura resultante denominada en el presente documento "GI-6108-DEC"). El cultivo en medio UL2 con pH tamponado expone los β -glucanos en la pared de la célula de levadura y se cree que modifica las respuestas inmunitarias celulares inducidas por la levadura como resultado de la modificación de las interacciones con receptores de dectina en células presentadoras de antígeno. Por consiguiente, las levaduras GI-6108 son estructural y funcionalmente diferentes de las levaduras GI-6108-DEC. Se incubaron los cultivos iniciadores con agitación a 30°C hasta una densidad de \sim 3 YU/ml, y luego se usaron para inocular un cultivo intermedio hasta 0,3 YU/ml. Se hicieron crecer los cultivos intermedios hasta una densidad de 3 YU/ml, y luego se usaron para inocular cultivos finales hasta una densidad de 0,04 YU/ml. Se hicieron crecer los cultivos finales hasta una densidad de 3 YU/ml, y luego se trataron con sulfato de cobre 0,5 mM durante 3 h a 30°C para inducir la expresión de antígeno agonista de MUC1.

Se lavaron las células inducidas, una vez con PBS, se destruyeron térmicamente a 56°C durante 1 h, y luego se lavaron tres veces en PBS. Se midió el contenido de proteína total de las células destruidas térmicamente, mediante el ensayo de Amidoschwarz y se midió el contenido de antígeno agonista mediante inmunotransferencia de tipo Western, con un anticuerpo monoclonal que reconoce una cola epitópica de hexahistidina C-terminal. Se determinó la cantidad de antígeno mediante interpolación frente a una curva patrón que comprendía su proteína HCV NS3 marcada.

Los resultados mostraron que la levadura GI-6108 expresó bastante el antígeno en el medio UL2, y se estimó que el contenido de antígeno para GI-6108 era de aproximadamente 2531 Ng/YU (datos no mostrados). La expresión de antígeno por la levadura GI-6108-DEC (es decir, GI-6108 hecha crecer en medio BT-UL2, condiciones de pH neutro) fue demasiado baja como para dar como resultado una cuantificación precisa mediante inmunotransferencia de tipo Western (datos no mostrados). No obstante, se usaron tanto GI-6108 como GI-6108-DEC en los experimentos descritos en el ejemplo 3.

EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra que composiciones para inmunoterapia de MUC1-levadura de la invención conocidas como GI-6108 y GI-6108-DEC pueden activar células T específicas de MUC1.

Líneas de células T - T-3-P93L es una línea de células T específica de MUC-1 que reconoce específicamente el péptido agonista de MUC1, indicado como P93L, en el contexto de HLA-A2. P93L es un péptido que abarca las posiciones 92-101 de una proteína MUC1-C de longitud completa (por ejemplo, ATWGQDVTSV, que corresponde a las posiciones 92-101 de SEQ ID NO: 14) excepto porque la treonina en la posición 2 de este péptido (posición 93 de las posiciones 92-101 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una leucina, creando de ese modo un péptido agonista. P93L se une a HLA-A2 a mayores niveles que el péptido nativo (de tipo natural), y es un mejor inductor de células T específicas de MUC1 que el péptido nativo (mayor producción de citocinas TH1) (véase la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0063653). La línea de células T T-3-P93L puede lisar específicamente dianas tumorales positivas para HLA-A2 y positivas para MUC1 *in vitro*. Esta línea de células T es específica para una parte de MUC1 que está dentro de la subunidad MUC1-N.

La célula T C1A es una línea de células T específica de MUC-1 que reconoce específicamente el péptido agonista de MUC1, indicado como C1A, en el contexto de HLA-A2. C1A es un péptido que abarca las posiciones 392-401 de una proteína MUC1 de longitud completa (por ejemplo, ALAIVYLIAL, que corresponde a las posiciones 392-401 de SEQ ID NO: 14) excepto porque la alanina en la posición 1 de este péptido (posición 392 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una tirosina, creando de ese modo un péptido agonista.

La célula T C2A T es una línea de células T específica de MUC-1 que reconoce específicamente el péptido agonista

de MUC1, indicado como C2A, en el contexto de HLA-A2. C2A es un péptido que abarca las posiciones 397-406 de una proteína MUC1 de longitud completa (por ejemplo, YLIALAVCQC; que corresponde a las posiciones 397-406 de SEQ ID NO: 14) excepto porque la cisteína en la posición 10 de este péptido (posición 406 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una valina, creando de ese modo un péptido agonista.

5 La célula T C3A es una línea de células T específica de MUC-1 que reconoce específicamente el péptido agonista de MUC1, indicado como C3A, en el contexto de HLA-A2. C3A es un péptido que abarca las posiciones 460-468 de una proteína MUC1 de longitud completa (por ejemplo, SLSYTNPAV, que corresponde a las posiciones 460-468 de SEQ ID NO: 14) excepto porque la serina en la posición 1 de este péptido (posición 460 en SEQ ID NO: 14) se sustituye por una tirosina, creando de ese modo un péptido agonista.

15 La célula T V1A es una línea de células T específica de MUC-1 que reconoce específicamente el péptido agonista de MUC1, indicado como VNTR-3, en el contexto de HLA-A2. V1A es un péptido que abarca las posiciones 150-158 de una proteína MUC1 de longitud completa (por ejemplo, STAPPAHGV, que corresponde a las posiciones 150-158 de SEQ ID NO: 14) excepto porque la alanina en la posición 1 de este péptido (posición 150 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una tirosina, y la treonina en la posición 2 de este péptido (posición 151 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una leucina, creando de ese modo un péptido agonista.

20 La célula T V2A es una línea de células T específica de MUC-1 que reconoce específicamente el péptido agonista de MUC1, indicado como VNTR-5, en el contexto de HLA-A2. V2A es un péptido que abarca las posiciones 141-149 de una proteína MUC1 de longitud completa (por ejemplo, APDTRPAPG, que corresponde a las posiciones 141-149 de SEQ ID NO: 14) excepto porque la alanina en la posición 1 de este péptido (posición 141 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una tirosina, y la prolina en la posición 2 de este péptido (posición 142 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una leucina, creando de ese modo un péptido agonista.

25 La célula T C5A es una línea de células T específica de MUC-1 que reconoce específicamente el péptido agonista de MUC1, indicado como C5A, en el contexto de HLA-A3. C5A es un péptido que abarca las posiciones 443-451 de una proteína MUC1 de longitud completa (por ejemplo, STDRSPYEK, que corresponde a las posiciones 443-451 de SEQ ID NO: 14) excepto porque la treonina en la posición 2 de este péptido (posición 444 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una leucina, y el aspartato en la posición 3 de este péptido (posición 445 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una fenilalanina, creando de ese modo un péptido agonista.

35 La célula T C6A es una línea de células T específica de MUC-1 que reconoce específicamente el péptido agonista de MUC1, indicado como C6A, en el contexto de HLA-A24. C6A es un péptido que abarca las posiciones 422-431 de una proteína MUC1 de longitud completa (por ejemplo, TYHPMSEYPT; que corresponde a las posiciones 422-431 de SEQ ID NO: 14) excepto porque la treonina en la posición 1 de este péptido (posición 422 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una tirosina, la prolina en la posición 9 de este péptido (posición 430 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una alanina, y la treonina en la posición 10 de este péptido (posición 431 de SEQ ID NO: 14) se sustituye por una leucina, creando de ese modo un péptido agonista. Esta línea de células T también se describe en el ejemplo 1.

40 Se usó una versión modificada del protocolo descrito por Tsang *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 87: 982-90 (1995), se usó para generar CTL específicos de MUC1. Se pulsaron DC autólogas irradiadas, con 20 µg/ml de péptido durante 2 horas, y luego se añadieron PBMC a una razón de 10:1. Después de 3 días, se añadió IL-2 humana (20 unidades Cetus/ml). Se reestimularon las células cada 7 días. Después de la tercer estimulación *in vitro* (IVS), se reestimularon las células usando células B transformadas con virus Epstein-Barr autólogas como células presentadoras de antígeno a una razón de 2:1, y se mantuvieron en medio que contenía IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (5 ng/ml).

50 En un primer experimento, se cultivaron células dendríticas (DC) de un donante humano normal para HLA-A2 durante 48 horas con: (1) medio solo (Medio); (2) levadura GI-6106-DEC (una composición inmunoterápica de MUC1-levadura de control positivo hecha crecer en condiciones de pH neutro, descrita previamente en la publicación PCT n.º WO 2013/024972); (3) levadura GI-6108 (una composición inmunoterápica de MUC1-levadura de la invención descrita en el ejemplo 2 que expresa un antígeno de MUC1 que comprende epítopos agonistas de HLA-A2, HLA-A3 y HLA-A24); (4) GI-6108-DEC (una composición inmunoterápica de MUC1-levadura de la invención que expresa un antígeno de MUC1 que comprende epítopos agonistas de HLA-A2, HLA-A3 y HLA-A24 que se hizo crecer en condiciones de pH neutro también tal como se describe en el ejemplo 2); y (5) GI-Vec (control de levadura), una levadura que comprende un vector vacío (sin inserción de antígeno de MUC1). Luego se usaron las DC tratadas como células presentadoras de antígeno (APC) para evaluar su capacidad para estimular las líneas de células T específicas de MUC1, restringidas a HLA-A2, P93L, C1A, C2A, C3A, V1A y V2A (razón de células T:DC = 10:1). También se incluyó un control "sin células T" para cada conjunto de DC. Se recogieron sobrenadantes de cultivo de 24 horas y se examinaron para determinar la secreción de interferón-γ (IFN-γ). Se muestran los resultados en la tabla 5, expresados como la cantidad de IFN-γ producida por las células T en pg/ml.

65 Tabla 5. Producción de IFN-γ por células T de HLA-A2 específicas de MUC1 estimuladas con DC humanas (HLA-A2) tratadas con constructos de agonista de MUC1-levadura (GI-6108 y GI-6108-DEC)

DC tratadas con:	Células T P93L	Células T C1A	Células T C2A	Células T C3A	Células T V1A (VNTR-3)	Células T V2A (VNTR-5)	Sin células T
Medio	<15,6	<15,6	<15,6	<15,6	<15,6	<15,6	<15,6
GI-6106-DEC (control positivo) HLA-A2/A3	1572	103	1603	321	266	148	<15,6
GI-6108 HLA-A2/A3/A24	1528	50	1607	272	153	55	<15,6
GI-6108-DEC HLAA2/A3/A24	1165	40	1514	147	81	75	<15,6
GI-Vec (levadura de control)	<15,6	17	<15,6	<15,6	36	28	<15,6
Razón DC:levadura = 1:10. Se expresan los resultados en pg/ml 2 x 10 ⁴ DC: 2 x 10 ⁵ células T en 1 ml							

5 Tal como se muestra en la tabla 5, las células dendríticas tratadas con GI-6108, produjeron tanto en condiciones habituales (GI-6108) como condiciones de pH neutro (GI-6108-DEC), y que expresan varios epítomos agonistas de MUC1 diferentes, pudieron estimular células T específicas de MUC1, restringidas a HLA-A2 para producir cantidades importantes de IFN-γ de manera y a un nivel similares al control positivo.

10 En un segundo experimento, se cultivaron DC de un donante humano normal para HLA-A3 o HLA-A24 durante 48 horas con: (1) medio solo (Medio); (2) levadura GI-6106-DEC; (3) levadura GI-6108; (4) GI-6108-DEC; y (5) GI-Vec (control de levadura). Luego se usaron las DC tratadas como APC para evaluar su capacidad para estimular la línea de células T específicas de MUC1, restringidas a HLA-A3, C5A o la línea de células T específicas de MUC1, restringidas a HLA-A24, C6A (razón de células T:DC = 10:1). También se incluyó un control "sin células T" para cada conjunto de DC. Se recogieron sobrenadantes de cultivo de 24 horas y se examinaron para determinar la secreción de IFN-γ. Se muestran los resultados en la tabla 6, expresados como la cantidad de IFN-γ producida por las células T en pg/ml.

15 Tabla 6. Producción de IFN-γ por células T específicas de MUC1 estimuladas con DC humanas (HLA-A3/HLA-A24) tratadas con constructos de agonista de MUC1-levadura (GI-6108 y GI-6108-DEC)

DC tratadas con:	Línea de células T C5A (P483A) HLA-A3	Línea de células T C6A (P-462A) HLA-A24	Sin células T
Medio	<15,6	<15,6	<15,6
GI-6106-DEC (control positivo) HLA-A2/A3	4230	1048	<15,6
GI-6108 HLA-A2/A3/A24	3664	2938	<15,6
GI-6108-DEC HLA-A2/A3/A24	3211	2590	<15,6
GI-Vec (control de levadura)	<15,6	<15,6	<15,6
Razón DC:levadura = 1:10. Se expresan los resultados en pg/ml de IFN-γ 2 x 10 ⁴ DC: 2 x 10 ⁵ células T en 1 ml			

20 Tal como se muestra en la tabla 6, células dendríticas tratadas con GI-6108, produjeron tanto en condiciones convencionales (GI-6108) como en condiciones de pH neutro (GI-6108-DEC), y que expresan los epítomos agonistas de MUC1 A3 y A24, pudieron estimular tanto células T específicas de MUC1, restringidas a HLA-A3 como células T específicas de MUC1, restringidas a HLA-A24 para producir cantidades importantes de IFN-γ de manera y a un nivel similares al control positivo.

25 Estos datos indican que una línea de células T específicas de HLA-A24 de MUC1 establecida usando epítomo agonista de HLA-A24 de MUC1 C6A puede activarse con DC humanas (positivas para HLA-A24) tratadas con constructos de agonista de MUC1-levadura (GI-6108 y GI-6108-DEC) que contienen epítomos agonistas HLA-de A2/A3/A24 de MUC1 y producen altos niveles de IFN-γ. Adicionalmente, estos datos indican que el epítomo agonista de HLA-A24 de línea de células T específicas de MUC1 puede activarse mediante el epítomo nativo de HLA-A24 puesto que vector GI-6106-DEC no contiene el epítomo agonista de HLA-A24 de MUC1.

EJEMPLO 4

35 Este ejemplo describe un ensayo clínico de fase 1 en sujetos con cáncer positivo para MUC1.

Se realiza un ensayo clínico de fase 1 abierto, de ampliación a escala de la dosis usando una composición para inmunoterapia de MUC1-levadura conocida como GI-6108 descrita en el ejemplo 2 (hecha crecer o bien en

condiciones habituales o bien en condiciones de pH neutro). A 12-24 sujetos con un tumor positivo para MUC1 que puede ser positivo para HLA-A2, HLA-A3 o HLA-A24 se les administra la composición para inmunoterapia de MUC1-levadura en un protocolo de ampliación a escala de cohortes de dosis secuenciales que utiliza intervalos de dosis de 4 YU (1 YU x 4 sitios), 16 YU (4 YU x 4 sitios), 40 YU (10 YU x 4 sitios) y 80 YU (20 YU x 4 sitios) administrados por vía subcutánea. La inmunoterapia con MUC1-levadura se administra a intervalos de 2 semanas durante 3 meses, y luego mensualmente, o se administra mensualmente. Se selecciona una cohorte de expansión de pacientes (n=10) a la dosis tolerada máxima (MTD) o a la mejor dosis observada para su estudio adicional. Los resultados monitorizan la seguridad como criterio de valoración principal, y como criterios de valoración secundarios, respuestas de células T específicas de antígeno (por ejemplo, células T CD8⁺ específicas de MUC1 que aparecen o que se expanden con el tratamiento) así como actividad clínica.

Se espera que GI-6108 sea segura y se tolere bien sin toxicidades importante. Además, se espera que GI-6108 produzca respuestas de células T específicas de MUC1 que aparecen con el tratamiento o una mejora de respuestas de células T de nivel inicial específicas de MUC1 en un número estadísticamente significativo de pacientes. También se espera que algunos pacientes tengan una enfermedad estabilizada.

EJEMPLO 5

Este ejemplo demuestra que epítomos agonistas de HLA-A24 de MUC1-C pueden activar células específicas de MUC1.

Se activó una línea de células T de HLA-A24 específicas de MUC1 establecida usando el epítomo agonista de HLA-A24 de MUC1, C6A con DC humanas positivas para HLA-A24 transfectadas con vectores de poxvirus (MVA) que contenían epítomos agonistas de MUC1, de HLA-A2/A3 de MUC1 (MVA-mBN-CV301). En particular, se trataron las DC humanas con 10 MOI de o bien (1) el clon 73 de MVA-mBN336 o bien (2) el clon 77 de MVA-mBN336 y se produjeron altos niveles de IFN-γ (véase la tabla 7).

Tabla 7. Pueden activarse células T específicas de epítomo agonista de HLA-A24 de MUC1 (C6A) con DC humanas (positivas para HLA-A24) transfectadas con vectores MVA-mBN-CV-301 y producir altos niveles de IFN-γ

DC tratadas con:	Línea de células T específica de epítomo agonista de HLA-A24 de MUC1 (C6A)	Sin células T
Medio	33,0	<15,6
clon 73 de MVA-mBN336 (que contiene epítomos agonistas de HLA-A2/A3 de MUC1 y epítomo nativo de HLA-A24)	1034	24,6
clon 77 de MVA-mBN336 (que contiene epítomos agonistas de HLA-A2/A3 de MUC1 y epítomo nativo de HLA-A24)	996	22,4
Se expresan los resultados en pg/ml de IFN-γ 2 x 10 ⁴ DC: 2 x 10 ⁵ células T en 1 ml		

Tal como se muestra en la tabla 7, pueden activarse líneas de células T específicas de epítomo agonista de HLA-A24 de MUC1 por el epítomo nativo de HLA-A24 puesto que los vectores MVA-mBN-CV301 no contienen el epítomo agonista de HLA-A24 de MUC1.

El uso de los términos “un(o)” y “una” y “el/la” y “al menos uno” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) ha de interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o lo contradiga claramente el contexto. El uso del término “al menos uno” seguido por una lista de uno o más elementos (por ejemplo, “al menos uno de A y B”) ha de interpretarse que significa un elemento seleccionado de los elementos enumerados (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos enumerados (A y B), a menos que se indique de otro modo en el presente documento o lo contradiga claramente el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” han de interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan “que incluyen, pero sin limitarse a”,) a menos que se indique de otro modo. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende servir meramente como método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor independiente que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor independiente se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionase individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento u lo contradiga claramente el contexto de otro modo. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento, pretende meramente ilustrar mejor la invención y no representa una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique de otro modo. No

debe interpretarse que ningún lenguaje en la memoria descriptiva indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la puesta en práctica de la invención.

5 Se describen realizaciones preferidas de esta invención en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Pueden resultar evidentes variaciones de esas realizaciones preferidas para los expertos habituales en la técnica tras la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que se ponga en práctica la invención de otro modo a como se describe específicamente en el presente documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del contenido
10 mencionado en las reivindicaciones adjuntas a la misma según lo permita la legislación aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención a menos que se indique de otro modo en el presente documento o lo contradiga claramente el contexto de otro modo.

15 **Lista de secuencias**

<110> LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, REPRESENTADOS POR EL SECRETARIO DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS

20 <120> Epítomos agonistas de HLA-A24 de oncoproteína MUC1-C y composiciones y métodos de uso

<130> E-520-2013/0-PCT-01

25 <150> Documento US 61/894.482

<151> 23-10-2013

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 1

40

Lys	Tyr	His	Pro	Met	Ser	Glu	Tyr	Ala	Leu
1				5					10

<210> 2

<211> 9

45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

50

<400> 2

Lys	Tyr	Thr	Asn	Pro	Ala	Val	Ala	Leu
1				5				

55

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 3

ES 2 693 213 T3

Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr
 1 5 10
 <210> 4
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Péptido sintético
 <400> 4
 Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala
 1 5
 15 <210> 5
 <211> 1255
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 5
 Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
 20 25 30
 Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
 35 40 45
 Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
 50 55 60
 Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
 65 70 75 80
 Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
 85 90 95
 Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
 100 105 110
 Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
 115 120 125
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 130 135 140
 Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 145 150 155 160
 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 165 170 175
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 180 185 190

ES 2 693 213 T3

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 195 200 205

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 210 215 220

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 245 250 255

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 260 265 270

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 275 280 285

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 290 295 300

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 305 310 315 320

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 325 330 335

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 340 345 350

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
 355 360 365

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 370 375 380

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
 405 410 415

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 420 425 430

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro

ES 2 693 213 T3

435		440		445											
Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr
450						455					460				
Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser
465					470					475					480
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His
				485					490					495	
Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala
			500					505					510		
Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro
		515					520					525			
Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr
		530				535					540				
Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser
545					550					555					560
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His
				565					570					575	
Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala
			580					585					590		
Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro
		595					600					605			
Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr
		610				615					620				
Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser
625					630					635					640
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His
				645					650					655	
Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala
			660					665					670		
Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro
		675					680					685			

ES 2 693 213 T3

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
690 695 700

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
705 710 715 720

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
725 730 735

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
740 745 750

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
755 760 765

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
770 775 780

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
785 790 795 800

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
805 810 815

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
820 825 830

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
835 840 845

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
850 855 860

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
865 870 875 880

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
885 890 895

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
900 905 910

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
915 920 925

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn
930 935 940

ES 2 693 213 T3

Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser
 945 950 955 960

Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly
 965 970 975

Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe
 980 985 990

Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His
 995 1000 1005

Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Ser Val Pro
 1010 1015 1020

Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr
 1025 1030 1035

Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln
 1040 1045 1050

Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu
 1055 1060 1065

Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln
 1070 1075 1080

Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser
 1085 1090 1095

Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn
 1100 1105 1110

Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala
 1115 1120 1125

Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp
 1130 1135 1140

Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly
 1145 1150 1155

Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu
 1160 1165 1170

Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg
 1175 1180 1185

ES 2 693 213 T3

Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr
 1190 1195 1200

His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr
 1205 1210 1215

Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser
 1220 1225 1230

Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
 1235 1240 1245

Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
 1250 1255

<210> 6
 <211> 1209
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (67)..(88)
 <400> 6

5

10

```

acctctcaag cagccagcgc ctgcctgaat ctgttctgcc ccctcccac ccatttcacc      60
accacc atg aca ccg ggc acc cag tct cct ttc ttc ctg ctg ctg ctc      108
      Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu
      1          5          10
ctc aca gtg ctt aca gtt gtt acg ggt tct ggt cat gca agc tct acc      156
Leu Thr Val Leu Thr Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr
15          20          25          30
cca ggt gga gaa aag gag act tcg gct acc cag aga agt tca gtg ccc      204
Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro
          35          40          45
agc tct act gag aag aat gct ttg tct act ggg gtc tct ttc ttt ttc      252
Ser Ser Thr Glu Lys Asn Ala Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe
          50          55          60
ctg tct ttt cac att tca aac ctc cag ttt aat tcc tct ctg gaa gat      300
Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp
          65          70          75
ccc agc acc gac tac tac caa gag ctg cag aga gac att tct gaa atg      348
Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met
          80          85          90
ttt ttg cag att tat aaa caa ggg ggt ttt ctg ggc ctc tcc aat att      396
Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile
95          100          105          110
    
```

ES 2 693 213 T3

aag ttc agg cca gga tct gtg gtg gta caa ttg act ctg gcc ttc cga 444
 Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg
 115 120 125

gaa ggt acc atc aat gtc cac gac gtg gag aca cag ttc aat cag tat 492
 Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr
 130 135 140

aaa acg gaa gca gcc tct cga tat aac ctg acg atc tca gac gtc agc 540
 Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser
 145 150 155

gtg agt gat gtg cca ttt cct ttc tct gcc cag tct ggg gct ggg gtg 588
 Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val
 160 165 170

cca gcc tgg ggc atc gcg ctg ctg gtg ctg gtc tgt gtt ctg gtt gcg 636
 Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala
 175 180 185 190

ctg gcc att gtc tat ctc att gcc ttg gct gtc tgt cag tgc cgc cga 684
 Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg
 195 200 205

aag aac tac ggg cag ctg gac atc ttt cca gcc cgg gat acc tac cat 732
 Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His
 210 215 220

cct atg agc gag tac ccc acc tac cac acc cat ggg cgc tat gtg ccc 780
 Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro
 225 230 235

cct agc agt acc gat cgt agc ccc tat gag aag gtt tct gca ggt aat 828
 Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn
 240 245 250

ggg ggc agc agc ctc tct tac aca aac cca gca gtg gca gcc act tct 876
 Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser
 255 260 265 270

gcc aac ttg tag gggcacgtcg cccgctgagc tgagtggcca gccagtgcc 928
 Ala Asn Leu

ttccactcca ctcaggttct tcagggccag agcccctgca ccctgtttgg gctggtgagc 988

tgggagtca ggtgggctgc tcacagcctc cttcagaggc cccaccaatt tctcgacac 1048

ttctcagtgt gtggaagctc atgtgggccc ctgagggctc atgcctggga agtgttgg 1108

tgggggctcc caggaggact ggcccagaga gccctgagat agcggggatc ctgaactgga 1168

ctgaataaaa cgtggtctcc cactgcgcca aaaaaaaaa a 1209

<210> 7
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr

5

10

ES 2 693 213 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (67)..(861)
 <400> 8

5

```

acctctcaag cagccagcgc ctgcctgaat ctgttctgcc ccctccccac ccatttcacc      60

accacc atg aca ccg ggc acc cag tct cct ttc ttc ctg ctg ctg ctc      108
      Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu
      1           5           10

ctc aca gtg ctt aca gct acc aca gcc cct aaa ccc gca aca gtt gtt      156
Leu Thr Val Leu Thr Ala Thr Thr Ala Pro Lys Pro Ala Thr Val Val
15           20           25           30

acg ggt tct ggt cat gca agc tct acc cca ggt gga gaa aag gag act      204
Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr
           35           40           45

tcg gct acc cag aga agt tca gtg ccc agc tct act gag aag aat gct      252
Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr Glu Lys Asn Ala
           50           55           60

ttt aat tcc tct ctg gaa gat ccc agc acc gac tac tac caa gag ctg      300
Phe Asn Thr Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu
65           70           75

cag aga gac att tct gaa atg ttt ttg cag att tat aaa caa ggg ggt      348
Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly
80           85           90

ttt ctg ggc ctc tcc aat att aag ttc agg cca gga tct gtg gtg gta      396
Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val
95           100           105           110

caa ttg act ctg gcc ttc cga gaa ggt acc atc aat gtc cac gac gtg      444
Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val
115           120           125

gag aca cag ttc aat cag tat aaa acg gaa gca gcc tct cga tat aac      492
Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn
130           135           140

ctg acg atc tca gac gtc agc gtg agt gat gtg cca ttt cct ttc tct      540
Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser
145           150           155

gcc cag tct ggg gct ggg gtg cca ggc tgg ggc atc gcg ctg ctg gtg      588
Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val
  
```


ES 2 693 213 T3

																Met	Thr	
																1		
ccg	ggc	acc	cag	tct	cct	ttc	ttc	ctg	ctg	ctg	ctc	ctc	aca	gtg	ctt	104		
Pro	Gly	Thr	Gln	Ser	Pro	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Val	Leu			
		5						10						15				
aca	gct	acc	aca	gcc	cct	aaa	ccc	gca	aca	gtt	gtt	aca	ggg	tct	ggg	152		
Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Pro	Lys	Pro	Ala	Thr	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Gly			
		20						25						30				
cat	gca	agc	tct	acc	cca	ggg	gga	gaa	aag	gag	act	tcg	gct	acc	cag	200		
His	Ala	Ser	Ser	Thr	Pro	Gly	Gly	Glu	Lys	Glu	Thr	Ser	Ala	Thr	Gln			
		35						40						45	50			
aga	agt	tca	gtg	ccc	agc	tct	act	gag	aag	aat	gct	ttt	aat	tcc	tct	248		
Arg	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Glu	Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Ser	Ser			
		55								60						65		
ctg	gaa	gat	ccc	agc	acc	gac	tac	tac	caa	gag	ctg	cag	aga	gac	att	296		
Leu	Glu	Asp	Pro	Ser	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Asp	Ile			
		70								75						80		
tct	gaa	atg	ttt	ttg	cag	att	tat	aaa	caa	ggg	ggg	ttt	ctg	ggc	ctc	344		
Ser	Glu	Met	Phe	Leu	Gln	Ile	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gly	Phe	Leu	Gly	Leu			
		85								90						95		
tcc	aat	att	aag	ttc	agg	cca	gga	tct	gtg	gtg	gta	caa	ttg	act	ctg	392		
Ser	Asn	Ile	Lys	Phe	Arg	Pro	Gly	Ser	Val	Val	Val	Gln	Leu	Thr	Leu			
		100								105						110		
gcc	ttc	cga	gaa	ggg	acc	atc	aat	gtc	cac	gac	atg	gag	aca	cag	ttc	440		
Ala	Phe	Arg	Glu	Gly	Thr	Ile	Asn	Val	His	Asp	Met	Glu	Thr	Gln	Phe			
		115								120						125	130	
aat	cag	tat	aaa	acg	gaa	gca	gcc	tct	cga	tat	aac	ctg	acg	atc	tca	488		
Asn	Gln	Tyr	Lys	Thr	Glu	Ala	Ala	Ser	Arg	Tyr	Asn	Leu	Thr	Ile	Ser			
		135								140						145		
gac	gtc	agc	gtg	agt	ggg	gtg	cca	ttt	cct	ttc	tct	gcc	cag	tct	ggg	536		
Asp	Val	Ser	Val	Ser	Gly	Val	Pro	Phe	Pro	Phe	Ser	Ala	Gln	Ser	Gly			
		150								155						160		
gct	ggg	gtg	cca	ggc	tgg	ggc	atc	gcg	ctg	ctg	gtg	ctg	gtc	tgt	ggt	584		
Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Trp	Gly	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Cys	Val			
		165								170						175		
ctg	ggt	gcg	ctg	gcc	att	gtc	tat	ctc	att	gcc	ttg	gct	gtc	tgt	cag	632		
Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Ile	Val	Tyr	Leu	Ile	Ala	Leu	Ala	Val	Cys	Gln			
		180								185						190		
tgc	cgc	cga	aag	aac	tac	ggg	cag	ctg	gac	atc	ttt	cca	gcc	cgg	gat	680		
Cys	Arg	Arg	Lys	Asn	Tyr	Gly	Gln	Leu	Asp	Ile	Phe	Pro	Ala	Arg	Asp			
		195								200						205	210	
acc	tac	cat	cct	atg	agc	gag	tac	ccc	acc	tac	cac	acc	cat	ggg	cgc	728		
Thr	Tyr	His	Pro	Met	Ser	Glu	Tyr	Pro	Thr	Tyr	His	Thr	His	Gly	Arg			
		215								220						225		
tat	gtg	ccc	cct	agc	agt	acc	gat	cgf	agc	ccc	tat	gag	aag	ggt	tct	776		
Tyr	Val	Pro	Pro	Ser	Ser	Thr	Asp	Arg	Ser	Pro	Tyr	Glu	Lys	Val	Ser			
		230								235						240		

ES 2 693 213 T3

gca ggt aat ggt ggc agc agc ctc tct tac aca aac cca gca gtg gca 824
 Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala
 245 250 255

gcc act tct gcc aac ttg tag gggcacgtcg cccgctgagc tgagtggcca 875
 Ala Thr Ser Ala Asn Leu
 260

gccagtgccca ttccaactcca ctcaggttct tcagggccag agcccctgca ccctgtttg 935

gctggtgagc tgggagtcca ggtgggctgc tcacagcctc cttcagaggc cccaccaatt 995

tctcggacac ttctcagtgt gtggaagctc atgtggg 1032

<210> 11

<211> 264

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15

Val Leu Thr Ala Thr Thr Ala Pro Lys Pro Ala Thr Val Val Thr Gly
 20 25 30

Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala
 35 40 45

Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr Glu Lys Asn Ala Phe Asn
 50 55 60

Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg
 65 70 75 80

Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu
 85 90 95

Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu
 100 105 110

Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Met Glu Thr
 115 120 125

Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr
 130 135 140

Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Gly Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val

5

10

ES 2 693 213 T3

			165						170					175	
Cys	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Ile	Val	Tyr	Leu	Ile	Ala	Leu	Ala	Val
			180					185						190	
Cys	Gln	Cys	Arg	Arg	Lys	Asn	Tyr	Gly	Gln	Leu	Asp	Ile	Phe	Pro	Ala
			195				200					205			
Arg	Asp	Thr	Tyr	His	Pro	Met	Ser	Glu	Tyr	Pro	Thr	Tyr	His	Thr	His
	210					215					220				
Gly	Arg	Tyr	Val	Pro	Pro	Ser	Ser	Thr	Asp	Arg	Ser	Pro	Tyr	Glu	Lys
225					230					235					240
Val	Ser	Ala	Gly	Asn	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Tyr	Thr	Asn	Pro	Ala
				245					250					255	
Val	Ala	Ala	Thr	Ser	Ala	Asn	Leu								
			260												

<210> 12
 <211> 1166
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 <222> (73)..(840)

<400> 12

cgctccacct	ctcaagcagc	cagcgcctgc	ctgaatctgt	tctgcccct	cccacccat	60		
ttcaccacca	cc atg aca	ccg ggc	acc cag	tct cct	ttc ttc	ctg ctg	ctg	111
	Met Thr	Pro Gly	Thr Gln	Ser Pro	Phe Phe	Leu Leu	Leu	
	1		5		10			
ctc ctc	aca gtg	ctt aca	gtt gtt	acg ggt	tct ggt	cat gca	agc tct	159
Leu Leu	Thr Val	Leu Thr	Val Val	Thr Thr	Gly Ser	Gly His	Ala Ser	Ser
	15		20		25			
acc cca	ggt gga	gaa aag	gag act	tcg gct	acc cag	aga agt	tca gtg	207
Thr Pro	Gly Gly	Glu Lys	Glu Thr	Ser Ala	Thr Gln	Arg Ser	Ser Val	
	30		35		40		45	
ccc agc	tct act	gag aag	aat gct	ttt aat	tcc tct	ctg gaa	gat ccc	255
Pro Ser	Ser Thr	Glu Lys	Asn Ala	Phe Asn	Ser Ser	Leu Glu	Asp Pro	
	50		55		60			
agc acc	gac tac	tac tac	caa gag	ctg cag	aga gac	att tct	gaa atg	303
Ser Thr	Asp Tyr	Tyr Tyr	Gln Glu	Leu Gln	Arg Asp	Ile Ser	Glu Met	Phe
	65		70		75			
ttg cag	att tat	aaa caa	ggg ggt	ttt ctg	ggc ctc	tcc aat	att aag	351
Leu Gln	Ile Tyr	Lys Gln	Gly Gly	Phe Leu	Gly Leu	Ser Asn	Ile Lys	
	80		85		90			

ES 2 693 213 T3

ttc agg cca gga tct gtg gtg gta caa ttg act ctg gcc ttc cga gaa 399
 Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu
 95 100 105

 ggt acc atc aat gtc cac gac gtg gag aca cag ttc aat cag tat aaa 447
 Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
 110 115 120 125

 acg gaa gca gcc tct cga tat aac ctg acg atc tca gac gtc agc gtg 495
 Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
 130 135 140

 agt gat gtg cca ttt cct ttc tct gcc cag tct ggg gct ggg gtg cca 543
 Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro
 145 150 155

 ggc tgg ggc atc gcg ctg ctg gtg ctg gtc tgt gtt ctg gtt gcg ctg 591
 Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu
 160 165 170

 gcc att gtc tat ctc att gcc ttg gct gtc tgt cag tgc cgc cga aag 639
 Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys
 175 180 185

 aac tac ggg cag ctg gac atc ttt cca gcc cgg gat acc tac cat cct 687
 Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro
 190 195 200 205

 atg agc gag tac ccc acc tac cac acc cat ggg cgc tat gtg ccc cct 735
 Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro
 210 215 220

 agc agt acc gat cgt agc ccc tat gag aag gtt tct gca ggt aat ggt 783
 Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly
 225 230 235

 ggc agc agc ctc tct tac aca aac cca gca gtg gca gcc act tct gcc 831
 Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala
 240 245 250

 aac ttg tag gggcacgtcg cccgctgagc tgagtggcca gccagtgcca 880
 Asn Leu
 255

 ttccactcca ctcaggttct tcagggccag agcccctgca ccctgtttgg gctggtgagc 940
 tgggagttca ggtgggctgc tcacagcctc cttcagaggc cccaccaatt tctcggacac 1000
 ttctcagtgt gtggaagctc atgtgggccc ctgagggctc atgcctggga agtgttgg 1060
 tgggggctcc caggaggact ggcccagaga gccctgagat agcggggatc ctgaactgga 1120
 ctgaataaaa cgtggtctcc cactgcgcca aaaaaaaaaa aaaaaa 1166

<210> 13
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 13

5

ES 2 693 213 T3

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp
50 55 60

Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile
65 70 75 80

Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro
85 90 95

Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile
100 105 110

Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala
115 120 125

Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val
130 135 140

Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly
145 150 155 160

Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val
165 170 175

Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly
180 185 190

Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu
195 200 205

Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr
210 215 220

Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser
225 230 235 240

Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
245 250 255

<210> 14
<211> 475
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

5

ES 2 693 213 T3

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50 55 60

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85 90 95

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100 105 110

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
130 135 140

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160

Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His
165 170 175

Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu
180 185 190

Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys
195 200 205

Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr
210 215 220

ES 2 693 213 T3

Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu
 245 250 255
 Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu
 260 265 270
 Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu
 275 280 285
 Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly
 290 295 300
 Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val
 305 310 315 320
 Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp
 325 330 335
 Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr
 340 345 350
 Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe
 355 360 365
 Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu
 370 375 380
 Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala
 385 390 395 400
 Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile
 405 410 415
 Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr
 420 425 430
 His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro
 435 440 445
 Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr
 450 455 460
 Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
 465 470 475

- 5 <210> 15
- <211> 1727
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Constructo sintético

ES 2 693 213 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1719)

5

<400> 15

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

ES 2 693 213 T3

cca gta aca aga cct gca tta gga tca aca act cca cct gct cac gat Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr Pro Pro Ala His Asp 195 200 205	624
gta aca agc gca cca gat aac aag cct gca cct ggc tct acc gct cca Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro 210 215 220	672
cct gcc cac ggc gta aca agt tat ttg gat aca aga cca gca cct gtt Pro Ala His Gly Val Thr Ser Tyr Leu Asp Thr Arg Pro Ala Pro Val 225 230 235 240	720
tac ttg gca cct cct gct cac ggt gtt aca tct gct cct gac aat aga Tyr Leu Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg 245 250 255	768
cca gct tta gga tct act gct cct cca gtg cat aac gta act tca gcc Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala 260 265 270	816
tca ggc tcc gca tcc ggt tct gct tca aca ctt gtc cac aat gga act Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr 275 280 285	864
tct gct aga gca aca aca aca cca gcc tct aaa agt act cct ttc tct Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser 290 295 300	912
atc cca tct cat cat tct gat act cct aca act tta gct tca cac tca Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser 305 310 315 320	960
act aaa aca gat gcc agt agt act cat cat tcc tct gta cca cct ctt Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Ser Val Pro Pro Leu 325 330 335	1008
aca tct tct aat cat tca aca tca cca caa ctc tcc act ggt gtg agc Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser 340 345 350	1056
ttc ttc ttc ctc tct ttt cac att tca aac ctg caa ttc aac tct tcc Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser 355 360 365	1104
cta gag gac cca tct acg gac tat tat caa gag ttg caa aga gat atc Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile 370 375 380	1152
agc gaa atg ttt cta cag atc tac aag caa ggt gga ttt ttg gga cta Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu 385 390 395 400	1200
tca aac ata aag ttt aga cca ggc agc gtt gtc gtc caa ctt acc tta Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu 405 410 415	1248
gct ttt aga gaa ggy act att aat gtt cat gat gtg gaa acc cag ttt Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe 420 425 430	1296
aat caa tac aag aca gaa gca gct tca cga tac aat ttg aca att tcc Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser 1344	1344

ES 2 693 213 T3

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala Thr Ser Met Thr Pro Gly Thr
85 90 95

Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Val
100 105 110

Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr
115 120 125

Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr Glu Lys Asn Ala
130 135 140

Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His Ser Pro Gly Ser Gly
145 150 155 160

Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu Ala Pro Ala Thr Glu
165 170 175

Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Leu Trp Gly Gln Asp Val Thr Ser Val
180 185 190

Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr Pro Pro Ala His Asp
195 200 205

Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro
210 215 220

Pro Ala His Gly Val Thr Ser Tyr Leu Asp Thr Arg Pro Ala Pro Val
225 230 235 240

Tyr Leu Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg
245 250 255

Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala
260 265 270

Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr
275 280 285

Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser
290 295 300

Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser
305 310 315 320

Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Ser Val Pro Pro Leu

ES 2 693 213 T3

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala
85

5 <210> 18
<211> 89
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

10 <400> 18

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala
85

15 <210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 19

Met Ala Asp Glu Ala Pro
1 5

25

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que el péptido tiene no más de 20 residuos de aminoácido, o en el que opcionalmente el péptido consiste en SEQ ID NO: 1.
2. Ácido nucleico que codifica para el péptido según la reivindicación 1.
3. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 2.
4. Célula que comprende (i) uno o más de los péptidos según la reivindicación 1, (ii) uno o más de los ácidos nucleicos según la reivindicación 2, o (iii) uno o más los vectores según la reivindicación 3, opcionalmente en la que opcionalmente la célula es humana, y/o en la que opcionalmente la célula es una célula presentadora de antígeno o célula tumoral.
5. Composición que comprende:
 - (a) uno o más de (i) los péptidos según la reivindicación 1, (ii) los ácidos nucleicos según la reivindicación 2, (iii) los vectores según la reivindicación 3, o (iv) las células según la reivindicación 4, y
 - (b) un portador farmacéuticamente aceptable, opcionalmente que comprende además una molécula inmunoestimuladora/reguladora, en la que opcionalmente la molécula inmunoestimuladora/reguladora se selecciona del grupo que consiste en interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, IL-15/IL15Ra, IL-15/IL-15Ra-Fc, interferón (IFN)- γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α , B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3, CD70, RANTES, G-CSF, OX-40L, 41 BBL, anticuerpo anti-CTLA-4, inhibidor deIDO, anticuerpo anti-PDL1, anticuerpo anti-PD1, y combinaciones de los mismos o en la que opcionalmente la molécula inmunoestimuladora se selecciona del grupo que consiste en (i) un plásmido que codifica para IL-12 complejada con quitosano y (ii) IL-12 recombinante mezclada con quitosano.
6. Composición según la reivindicación 5, que comprende además un fármaco quimioterápico, agente radiactivo, antimetabolito, hormona, antagonista de hormona, antibiótico, fármaco antiviral, fármaco antifúngico, ciclofosfamida, o una combinación de los mismos, o un agente de alquilación, antagonista de folato, antagonista de purina, antagonista de pirimidina, veneno del huso, inhibidor de topoisomerasa, agente inductor de apoptosis, inhibidor de la angiogénesis, podofilotoxina, nitrosourea, cisplatino, carboplatino, interferón, asparginasa, tamoxifeno, leuprolida, flutamida, megestrol, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, irinotecán, Taxol, geldanamicina, o una combinación de los mismos, o

Adriamycin, Alkeran, Ara-C, busulfano, CCNU, carboplatino, cisplatino, Cytoxan, daunorubicina, DTIC, 5-FU, fludarabina, Hydrea, idarubicina, ifosfamida, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza de nitrógeno, Taxol, Velban, vincristina, VP-16, gemcitabina, Herceptin, irinotecán, Leustatin, Navelbine, Rituxan STI-571, Taxotere, topotecán, capecitabina, Zevelin, enzalutamida, calcitriol, o una combinación de los mismos.
7. Composición según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, que comprende además uno o más adyuvantes, opcionalmente en la que uno o más adyuvantes se selecciona del grupo que consiste en alumbre, sales de aluminio, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, sílice de aluminio, fosfato de calcio, adyuvante incompleto de Freund, QS21, MPL-A, RIBI DETOX™, y combinaciones de los mismos.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que comprende además un factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), opcionalmente que comprende además liposomas.
9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, para su uso en un método de potenciación de una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 al sujeto, en la que se potencia la respuesta inmunitaria en el sujeto.
10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, para su uso en un método de inhibición de un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto que comprende:
 - (a) estimular linfocitos obtenidos de un sujeto con la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 para generar linfocitos T citotóxicos *ex vivo*, y
 - (b) administrar los linfocitos T citotóxicos al sujeto,

- (a) tratar células dendríticas obtenidas de un sujeto con la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 *ex vivo*, y
- 5 (b) administrar las células dendríticas tratadas al sujeto,
- o
- (a) aislar células dendríticas de PBMC obtenidas de un sujeto,
- 10 (c) tratar las células dendríticas con la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 *ex vivo*,
- (d) activar las PBMC obtenidas del sujeto con las células dendríticas tratadas *ex vivo*, y
- 15 (e) administrar las PBMC activadas al sujeto,
- o
- (a) aislar células dendríticas de PBMC obtenidas de un sujeto,
- 20 (b) tratar las células dendríticas con la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 *ex vivo*,
- (c) activar las PBMC obtenidas del sujeto con las células dendríticas tratadas *ex vivo*,
- 25 (d) aislar linfocitos T de las PBMC activadas *ex vivo*, y
- (e) administrar los linfocitos T aislados al sujeto,
- 30 en la que se inhibe el cáncer que expresa MUC1 en el sujeto.
11. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura, en la que la composición inmunoterápica comprende:
- 35 (a) un vehículo de levadura; y
- (b) una proteína de fusión que comprende al menos un antígeno de mucina-1 (MUC1),
- en la que el antígeno de MUC1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 40 12. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura, en la que la composición inmunoterápica comprende:
- (a) un vehículo de levadura; y
- 45 (b) una proteína de fusión que comprende al menos un antígeno de MUC1, en la que el antígeno de MUC1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80% a (i) SEQ ID NO: 16, (ii) posiciones 92-566 de SEQ ID NO: 16, o (iii) una secuencia correspondiente de una proteína MUC1 diferente, y en la que el antígeno de MUC1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, opcionalmente en la que el antígeno de MUC1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95% a (i) SEQ ID NO: 16, (ii) posiciones 92-566 de SEQ ID NO:16, o (iii) una secuencia correspondiente de una proteína MUC1 diferente, y en la que el antígeno de MUC1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 50 13. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura según la reivindicación 12, en la que el antígeno de MUC1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95% a las posiciones 92-566 de SEQ ID NO: 16, opcionalmente en la que el antígeno de MUC1 consiste en las posiciones 92-566 de SEQ ID NO: 16.
- 55 14. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en la que la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.
- 60 15. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en la que el vehículo de levadura es una levadura completa, y/o
- 65 en la que la proteína de fusión se ha expresado por la levadura y/o
- en la que el vehículo de levadura se ha inactivado por calor, y/o

en la que el vehículo de levadura procede de *Saccharomyces cerevisiae*, y/o

en la que la composición inmunoterápica se ha producido cultivando una levadura completa que expresa el antígeno de MUC1 en un medio que se mantuvo a un nivel de pH de entre 5,5 y 8.

- 5
16. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para su uso en un método de reducción de la carga tumoral, inhibición del crecimiento tumoral y/o aumento de la supervivencia de un individuo que tiene un cáncer que expresa MUC1, que comprende administrar al individuo la composición inmunoterápica de MUC1-levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, opcionalmente en la que se detecta la expresión de MUC1 en el cáncer del individuo en el momento en que se administra por primera vez la composición, y/o en la que el individuo está tratándose o se ha tratado con al menos una terapia adicional para el cáncer, opcionalmente en la que la al menos una terapia adicional se selecciona de quimioterapia, terapia dirigida contra el cáncer, radioterapia, transferencia adoptiva de células T, y/o la administración de una o más composiciones inmunoterápicas adicionales.
- 10
17. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para su uso en un método de prevención o retraso de la aparición de un cáncer que expresa MUC1, que comprende administrar a un individuo la composición inmunoterápica de MUC1-levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en la que opcionalmente no se ha detectado cáncer en el individuo, en la que opcionalmente el individuo corre un alto riesgo de desarrollar cáncer.
- 20
18. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para su uso según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en la que el cáncer tiene su origen en células epiteliales, o en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de esófago, leucemia mielógena múltiple (MML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, cánceres de tejidos secretores, y cánceres metastásicos de los mismos.
- 25
19. Composición inmunoterápica de MUC1-levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para su uso en
- 30
- 35 el tratamiento de un cáncer, o
- la reducción, detención, reversión o prevención de la progresión metastásica de cáncer en un individuo que tiene cáncer, o la prevención o el retraso de la aparición de un cáncer que expresa MUC1.
- 40
20. Proteína MUC1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
21. Vector según la reivindicación 3 para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto, en el que el vector es un vector de poxvirus, que comprende:
- 45
- (a) administrar al sujeto un primer vector de poxvirus que comprende un ácido nucleico que codifica para el péptido según la reivindicación 1; y
- (b) administrar al sujeto un segundo vector de poxvirus que comprende un ácido nucleico que codifica para el péptido según la reivindicación 1,
- 50
- induciendo de ese modo una respuesta inmunitaria frente a un cáncer que expresa MUC1 en el sujeto,
- en el que opcionalmente los vectores de poxvirus primero y segundo comprenden un ácido nucleico que codifica para la proteína MUC1 según la reivindicación 11 y/o
- 55
- en el que opcionalmente los vectores de poxvirus primero y segundo comprenden además un ácido nucleico que codifica para el antígeno carcinoembrionario (CEA).
22. Vector según la reivindicación 3, para su uso según la reivindicación 21, en el que los vectores de poxvirus primero y segundo comprenden además un ácido nucleico que codifica para uno o más moléculas coestimuladoras, en el que opcionalmente la una o más moléculas coestimuladoras se seleccionan de B7.1, ICAM-1 y LFA-3.
- 60
23. Vector según la reivindicación 3, para su uso según la reivindicación 21 o la reivindicación 22, en el que el primer vector de poxvirus es un virus vaccinia y el segundo vector de poxvirus es un virus de viruela aviar, o
- 65

ES 2 693 213 T3

en el que el primer vector de poxvirus es un virus vaccinia Ankara modificado (MVA) y el segundo vector de poxvirus es un virus de viruela aviar, en el que opcionalmente el virus MVA es MVA-BN, y/o

5 en el que los vectores de poxvirus primero y segundo se administran al sujeto en un protocolo de sensibilización-refuerzo.