

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 570**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 9/20	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2012 PCT/US2012/050024**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13022991**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2012 E 12821946 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2750694**

54 Título: **Métodos y composiciones relacionadas con p62 para el tratamiento y la profilaxis del cáncer**

30 Prioridad:

08.08.2011 US 201161521280 P

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

05.02.2019

73 Titular/es:

**CURELAB ONCOLOGY, INC. (100.0%)
417 Greenlodge St.
Dedham, MA 02026, US**

72 Inventor/es:

**SHNEIDER, ALEXANDER;
VENANZI, FRANCO;
SHERMAN, MICHAEL y
SHIFRIN, VICTOR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 698 570 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

Métodos y composiciones relacionadas con p62 para el tratamiento y la profilaxis del cáncer

Referencia transversal a solicitudes de patentes relacionadas

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere en general al campo de la prevención y el tratamiento del cáncer. Más específicamente, la invención se refiere a la prevención y el tratamiento del cáncer mediante la activación de la respuesta contra el cáncer utilizando composiciones de p62.

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer es la segunda causa más común de muerte en los Estados Unidos y la Unión Europea (National Vital Statistics Reports, vol. 60, No. 4, 2012) y la primera causa más común de muerte entre personas de 45 a 64 años, tanto para hombres como para mujeres, en la Unión Europea. La prevalencia estimada del cáncer en los Estados Unidos a partir del 1 de enero de 2008 fue de 5.506.000 casos de tumores invasivos para hombres y 6.452.000 casos para mujeres.

- 15 Las vacunas contra el cáncer están bajo investigación, con algunas en estudios de eficacia en Fase III (Rosenberg et al., Nat Med., 10: 909 (2004), Johnson et al., Expert Rev Anticancer Ther., 9:67 (2009) 3.4). Varias vacunas contra el cáncer están dirigidas contra tumores sólidos: cáncer de melanoma, próstata, pulmón, mama y colorrectal. Dos poblaciones de alto riesgo se beneficiarán particularmente de las vacunas preventivas contra el cáncer: los pacientes con tumores extirpados quirúrgicamente que pertenecen a tipos de cáncer que se sabe que tienen un alto potencial metastásico (por ejemplo, ovario o algunos tipos de cáncer de mama) y también portadores de mutaciones conocidas, asociado con un mayor riesgo del cáncer (por ejemplo, mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 para los cánceres de mama y ovario, gen RAD51 para el cáncer de ovario, etc.). La vacunación preventiva selectiva de mujeres de alto riesgo es una tarea importante de salud pública.

- 20 p62 es una proteína multifuncional que se une a la ubiquitina y regula la activación de la vía de señalización del factor nuclear kappa-B (NF-kB). La proteína funciona como una proteína de estructura/adaptador en concierto con el factor 6 asociado al receptor de TNF para mediar la activación de NF-kB en respuesta a las señales en sentido ascendente. Alternativamente, se han identificado variantes de transcripción empalmadas que codifican isoformas iguales o diferentes para este gen.

- 25 p62 se identificó como una proteína de 62 kDa que se unía al dominio de homología src 2 (SH2) de la tirosina quinasa Lckp56 de manera independiente de la fosfotirosina (Park et al., Proc Natl Acad Sci USA., 92: 12338 (1995)). La secuencia primaria de p62 es conocida (Joung et al., Proc Natl Acad Sci USA., 93: 5991, (1996)), y se demostró que se unía a la ubiquitina (Vadlamudi et al., J. Biol. Chem., 271: 20235 (1996)). Puede accederse a la secuencia de ADN de p62 humano, secuencia de Homo sapiens sequestosome 1 (SQSTM1), variante de transcripción 1, ARNm, en la secuencia de referencia de NCBI: NM_003900.4. Se puede acceder a la secuencia de aminoácidos de p62 humana, isquorma 1 del sequestosoma-1 [Homo sapiens], en la secuencia de referencia NCBI: NP_003891.1. p62 no tiene homología con hidrolasas C-terminales de ubiquitina ni con la subunidad S5a del complejo proteasoma 26 S, las únicas proteínas conocidas que se unen a la ubiquitina de manera no covalente. Estos resultados sugieren que p62 pertenece a una nueva clase de proteínas de unión a ubiquitina.

- 30 La p62 es un componente de los cuerpos de inclusión que se encuentra en las enfermedades de agregación de proteínas en el cerebro y el hígado: la p62 se encuentra secuestrada en cuerpos de inclusión citoplásmicos, llamados sequestosomas. Estos agregados de proteínas que contienen p62 se degradan por autofagia. Se sugirió que esta función de p62 puede tener un efecto protector sobre la muerte celular inducida por huntingtina (Björkøy et al., J Cell Biol., 171: 603 (2005)). Las mutaciones en el gen p62 se han asociado con la enfermedad de Paget familiar y esporádica (Jenny Chung et al., Semin Arthritis Rheum., 41: 619 (2012)), una enfermedad ósea metabólica.

45 Sumario de la invención

- En el presente documento se proporcionan métodos para tratar, aliviar, mejorar, aliviar, retrasar la aparición, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas de un cáncer en un sujeto administrando al sujeto un agente que tiene (a) un polipéptido p62 o (b) un ácido nucleico que codifica p62. El agente puede tener (a) una o más deleciones de dominio, (b) un ácido nucleico que codifica p62 que es al menos un 95% idéntico a la SEQ ID NO. 1, o (c) un polipéptido p62 que es al menos un 98% idéntico a la SEQ ID NO: 2. Las eliminaciones del dominio del método pueden ser una o más de las siguientes: PB1, ZZ, NLS2, TB, NLS1, NES, LIR, KIR y UBA. El método puede usar un polipéptido de fusión o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, respectivamente. El método puede usar un polipéptido p62 que se modifique después de la traducción.

- 55 El agente puede administrarse por cualquiera de las siguientes vías: por vía parenteral, oral, nasal, rectal, transdérmica, intravaginal o inhalatoria a través de un aerosol. Las vías parenterales pueden ser cualquiera de las

5 siguientes: intravascular, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intradérmica y subcutánea, o pueden administrarse a un órgano o tumor. El método puede incluir además cualquiera y todos los siguientes: administración de adyuvantes, administración de componentes coestimulantes, administración de una o más moléculas que bloquean mecanismos inmunitarios supresores o reguladores negativos, o administración de una o más terapias anticancerosas a dicho sujeto.

10 El método puede usarse para tratar cualquier tipo de cáncer en un sujeto que incluye: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de bronquios, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer cerebral, cáncer del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad bucal o faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículo, cáncer del tracto biliar, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de glándula salivar, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma y cáncer de tejidos hematológicos. El sujeto puede ser: un sujeto diagnosticado con cáncer, un sujeto previamente tratado para el cáncer, un sujeto con antecedentes familiares de cáncer o un sujeto predispuesto al cáncer.

15 El método puede incluir un agente que es un ácido nucleico que codifica p62 y el ácido nucleico puede incluirse en un plásmido o un vector viral. El método también puede incluir una estrategia para mejorar la eficiencia de la inmunización basada en ácidos nucleicos.

20 En este documento también se proporcionan agentes para tratar, aliviar, mejorar, calmar, retrasar la aparición, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas de un cáncer en un sujeto que es un polipéptido p62 o un ácido nucleico que codifica p62, que tiene al menos una o más delecciones de dominio, o compuesto de uno o más dominios de un polipéptido p62 o un ácido nucleico que codifica uno o más dominios de un p62. El uno o más dominios pueden estar entre los siguientes: PB1, ZZ, NLS2, TB, NLS1, NES, LIR, KIR y UBA.

El agente puede incluir un polipéptido de fusión o un ácido nucleico codificante, respectivamente. El polipéptido p62 puede modificarse después de la traducción.

25 El agente puede incluir además uno o más adyuvantes, uno o más componentes coestimulantes, o una o más moléculas que bloquean mecanismos inmunitarios supresores o reguladores negativos, una o más moléculas quimioterapéuticas o moléculas antiangiogénicas.

El agente puede ser un ácido nucleico que codifica p62 además que es un componente de un plásmido o un vector viral.

30 En este documento también se proporcionan composiciones que incluyen el agente adecuado para la administración a un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra una secuencia de ácido nucleico natural de p62 humano (SEQ ID NO: 1).

35 La Fig. 2 muestra una secuencia de aminoácidos natural de la p62 humana codificada por la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 3 muestra una representación de la estructura de dominio del p62 humano.

La Fig. 4 muestra una comparación de un curso temporal de formación de tumores en un modelo de cáncer de mama en ratones para ratones inyectados con una vacuna de ADN de p62, HER2 (control positivo) o vector solo (control negativo).

40 La Fig. 5 muestra la tinción con hematoxilina y eosina (HE) de tumores de animales inmunizados con p62. El panel superior: las flechas apuntan a múltiples focos de necrosis. El panel inferior: las flechas apuntan a una malla de células inflamatorias.

45 La Fig. 6 muestra la tinción inmuno-histoquímica de tumores de animales inmunizados con HER2 y p62. Los paneles de la izquierda muestran la tinción HE, los paneles centrales muestran la tinción anti-CD3 y los paneles de la derecha muestran la tinción anti-CD11b.

La Fig. 7 muestra una línea de tiempo gráfica de la administración de la vacuna de ADN p62 en un modelo de cáncer de mama de rata T5:

La Fig. 8 muestra un curso temporal del volumen del tumor en ratas vacunadas con p62 y de control con carcinoma de mama transplantable T5.

50 La Fig. 9 muestra el curso temporal de la inhibición del crecimiento tumoral en ratas vacunadas con p62 y de control con carcinoma de mama transplantable con T5.

La Fig. 10 muestra un curso temporal de la supervivencia de ratas en ratas vacunadas con p62 y de control con carcinoma de mama transplantable T5.

La Fig. 11 muestra secciones de tumores de ratas vacunadas con p62 y vector control con carcinoma de mama transplantable T5.

5 La Fig. 12 muestra la tinción con hematoxilina y eosina (HE) de las secciones tumorales de ratas vacunadas con p62 y vector control con carcinoma de mama transplantable con T5.

La Fig. 13 muestra una comparación del número de metástasis del carcinoma de pulmón de Lewis entre ratones vacunados con p62 y vector control.

Descripción detallada de la invención

10 En este documento se proporcionan composiciones de p62 y métodos para el tratamiento del cáncer. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría, los inventores han encontrado que al administrar el ácido nucleico que codifica p62 a un sujeto, el mecanismo de defensa inmune del huésped se estimula para atacar a las células neoplásicas. En consecuencia, las vacunas de ADN que codifican un polipéptido p62, o polipéptidos p62, administradas a un sujeto pueden estimular una respuesta inmune contra el cáncer. La presente invención se define por las reivindicaciones 1-15.

15 Como se usa en el presente documento, "polipéptido p62" significa un polipéptido que corresponde a la proteína p62/SQSTM1 de longitud completa. El término incluye todos los homólogos, análogos, fragmentos o derivados de la proteína p62/SQSTM1. En una realización, el polipéptido p62 aislado tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la FIG. 2 (SEQ ID NO: 2). Un "ácido nucleico que codifica p62" significa un ADN o ARN que codifica un polipéptido p62.

20 En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, por ejemplo, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo, un ciervo, un perro, un gato, una rata o un ratón.

25 Además de la secuencia de aminoácidos de longitud completa, los polipéptidos de la presente invención también pueden incluir fragmentos o truncamientos, análogos y homólogos del polipéptido p62 y sus truncamientos, como se describe en el presente documento. Los fragmentos pueden incluir péptidos de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 residuos de aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

30 También se incluyen deleciones de uno o más aminoácidos, o porciones discretas de la secuencia de aminoácidos de la proteína p62/SQSTM1. Los aminoácidos eliminados pueden o no ser contiguos. La longitud límite inferior del análogo resultante con una mutación por delección es de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 50 o aproximadamente 100 aminoácidos.

35 En algunas realizaciones, el polipéptido p62 tiene uno o más dominios eliminados. Si bien no se desea estar vinculado a ninguna teoría, los inventores sostienen que la eliminación de uno o más dominios del polipéptido p62 proporciona un polipéptido más compacto y manipulable para dirigir una respuesta inmune. Por ejemplo, al interrumpir o eliminar uno o más de los dominios de un polipéptido p62, la inmunogenicidad puede mantenerse (o mejorarse, si el dominio eliminado o interrumpido no contribuye a la inmunogenicidad) en una molécula más compacta y potencialmente aumentar el número de epítopos presentados para alojar anticuerpos en una base por peso. Además, la eliminación o reordenación de los dominios responsables para el compromiso con otros procesos celulares o su propia degradación de proteínas intracelulares puede mejorar su efecto anticancerígeno. El polipéptido p62 tiene una estructura de dominio como se proporciona en la Tabla 1 a continuación y como se muestra en la FIG. 3:

Tabla 1. Estructura del dominio del polipéptido p62

Dominio/sitio	Nombre completo	Ubicación	Descripción
PB1	dominio Phox/Bem1p (=dominio OPR)	20-102	El dominio PB1 se conserva entre los eucariotas (protista, plantas, hongos y animales). El dominio PB1 tiene un plegamiento de agarre β tipo ubiquitina específico. Hay 3 tipos de dominios PB1: los dominios de tipo I contienen un motivo OPCA ácido, los dominios tipo II contienen residuos Lys conservadores en la primera hoja β, y los dominios de tipo I/II contienen ambos de los anteriores. El motivo OPCA se puede unir a los aminoácidos básicos (por ejemplo, lisina) a través de los puentes salinos, permitiendo la capacidad de los dominios PB1 para formar estructuras heteroméricas (Sumimoto et al., 2007Sci STKE., 401: 6 (2007)). El dominio PB1 de p62 es de tipo I/II (Lamark et al., 2003 J Biol Chem., 278: 34568 (2003)). El dominio PB1 es responsable de la di- y multi-merización de p62, así como

ES 2 698 570 T3

			también de la interacción con otras proteínas: MEKK3, MEK5, PKC ζ , PKC λ/μ (proteína quinasas que contienen el dominio PB1), NBR1 (Junto a BRCA1, contiene el dominio PB1) (Nezis, Stenmark, 2011 Antioxid Redox Signal., 17: 786 (2011)).
ZZ	dedo Zn ²⁺ tipo ZZ	122-167	El dominio ZZ es Zn ²⁺ - dedo de tipo C2H2. El dominio ZZ de p62 se une a RIP1 (proteína 1 que interactúa con el receptor). RIP1 es una proteína reguladora quinasa que integra las vías de señalización activadas por la infección bacteriana o viral (a través de PAMP), receptores de muerte o genotoxinas; participa en la determinación del destino celular (supervivencia, apoptosis o necrosis) (Festjens et al., Cell Death Differ., 14: 400 (2007)).
NLS2	Señal de localización nuclear 2	183-194	señal de localización nuclear tentativa (Pankiv et al., J Biol Chem., 285: 5941 (2009))
TB	dominio de unión TRAF6	228-233	p62 se une a través del dominio TB a la proteína ligasa de ubiquitina E3 TRAF6. TRAF6 activa la quinasa TAK1, poliubiquitándola a través de K63). TRAF6 participa en la señalización de los receptores RANK-L, IL-1R, TCR, BCR y TGF β (Landström, Int J Biochem Cell Biol., 42: 585 (2010)). La interacción de p62 con TRAF6 estimula la autoubiquitinación de la actividad de TRAF6 E3- ligasa. Este proceso requiere dominios PB1 y UBA (Moscat et al., Mol Cell., 23: 631 (2006)).
NLS1	Señal de localización nuclear 1	261-273	Señal de localización nuclear tentativa (Pankiv et al., 2009)
NES	Señal de exportación nuclear	303-321	Señal de exportación nuclear tentativa (Pankiv et al., 2009)
LIR	región de interacción LC3	321-342	El dominio LIR se requiere para la unión de p62 a la proteína LC3 (proteína asociada al microtúbulo humano natural 1, cadena ligera 3, cadena ligera 3) (Pankiv et al., J. Biol Chem., 282: 24131 (2007) LC3 - proteína tipo ubiquitina, conjugando la membrana fosfatidil etanolamina del autofagosoma (Tanida, Microbiol Immunol., 55: 1 (2011)). P62 a través de la interacción con LC3, p62 se recluta para autofagosomas (Shvets et al., Autophagy, 7: 683 (2011)), aparentemente transportando proteínas ubiquitinadas asociadas con el dominio UBA.
KIR	región de interacción Keap1	343-357	El dominio KIR es necesario para la interacción con el dominio DC de la proteína Keap1, que contiene repeticiones de Kelch (Komatsu et al., Nat Cell Biol., 12: 213 (2010)). Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch) es un regulador de la actividad del factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado con NF-E2). Nrf2 regula la expresión de genes involucrados en la síntesis de glutatión, desintoxicación de ROS, metabolismo de xenobióticos y transporte de fármacos (Taguchi et al., Genes Cells, 16: 123 (2011)). La sobreexpresión de p62 desplaza Nrf2 de Keap1, Nrf2 se estabiliza lo que conduce a la estimulación de la expresión de los genes dependientes de Nrf2. Paradójicamente, la hiperactivación de Nrf2 y la sobreexpresión de los genes consideradas "citoprotectoras" causan patologías graves (Komatsu et al., 2010).
UBA	Dominio asociado a ubiquitina	389-434	El dominio UBA es uno de los dominios que pueden unirse a los marcadores poliubiquitinados (junto con CUE, UIM, NZF, etc.). Los dominios UBA se pueden dividir en cuatro clases dependiendo de su capacidad para unir los marcadores de poliubiquitina de diferentes estructuras (K6, K29, K48, K63). El dominio UBA de p62 pertenece a la clase 4, que consiste en dominios con la misma afinidad para unirse a K6, K29, K48, K63 (Raasi et al., Nat Struct Mol Biol., 12: 708 (2005)). El dominio UBA también participa en la dimerización de p62 (Garner et al., Biochemistry, 50: 9076 (2011)). La mayoría de las

			mutaciones asociadas con la enfermedad de Paget están localizadas en el dominio UBA (Yan Jenny Chung, Van Hul, Semin Arthritis Rheum, 4: 619 (2011)). Sin embargo, las mutaciones p62 no son suficientes para que los osteoblastos adquieran el fenotipo de Paget específico: también se requiere la expresión de la proteína nucleocápsida del virus del sarampión (Singer, Cell Metab., 13: 5 (2011)). La estructura del dominio UBA está bien estudiada (Isogai et al., J Biol Chem, 286: 31864 (2011)).
--	--	--	---

Numeración de la secuencia: NP_003891 (isoforma 1 de sequestosoma-1 [Homo sapiens]).

En algunas realizaciones, se eliminan uno o más de los dominios anteriores a partir de un polipéptido p62 en los codones correspondientes para las regiones de ácido nucleico del ácido nucleico p62 (delecciones en el marco), como se presenta a continuación en la Tabla 2.

5

Tabla 2. Eliminaciones en p62

Dominio eliminado	Inicio de la eliminación, entre nucleótidos	Fin de la eliminación, entre nucleótidos
PB1	1 y 20	102 y 122
ZZ	102 y 122	167 y 183
NLS2	167 y 183	194 y 228
TB	194 y 228	233 y 261
NLS1	233 y 261	273 y 303
NES-LIR-KIR	273 y 303	357 y 389
UBA	Codón de parada entre 357 y 389	No aplicable

Los números de nucleótidos se refieren a la secuencia de referencia de NCBI p62 NP_003891 (sequestosoma-1 isoforma 1 [Homo sapiens]).

10 Por ejemplo, cualquier supresión de la secuencia de ácido nucleico codificante que comience en el nucleótido 102 hasta el nucleótido 122 y termine en 167 hasta 183 se considera una delección ZZ. Por lo tanto, por ejemplo, un 110-175 es una eliminación ZZ. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para crear eliminaciones en marco.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido p62 (o el polipéptido p62 codificado por un ácido nucleico) está compuesto por uno o más de los dominios anteriores. En algunas realizaciones, el polipéptido p62 (o el polipéptido p62 codificado por un ácido nucleico) está compuesto por dos o más de los dominios anteriores y aún más realizaciones, los dominios son los que componen el polipéptido en un orden de extremo N- a C-terminal diferente que el presentado en el polipéptido p62 natural.

20 Como se usa en este documento, "biológicamente activo o inmunológicamente activo" se refiere a polipéptidos que tienen una función estructural similar (pero no necesariamente en el mismo grado), y/o una función reguladora similar (pero no necesariamente en el mismo grado), y/o función bioquímica similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o actividad inmunológica (pero no necesariamente en el mismo grado) que los polipéptidos naturales individuales.

Como se usa en este documento, una "eliminación" se define como un cambio en la secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos están ausentes en comparación con la proteína natural.

25 Como se usa en este documento, una "inserción" o "adición" es un cambio en una secuencia de aminoácidos que ha resultado en la adición de uno o más residuos de aminoácidos en comparación con la proteína natural.

Como se usa en este documento, "sustitución" resulta del reemplazo de uno o más aminoácidos por diferentes aminoácidos, respectivamente, en comparación con la proteína natural. En algunas realizaciones, la mutación de sustitución es C145R o Q418R.

30 Como se usa en este documento, el término "variante" significa cualquier polipéptido que tenga una sustitución, supresión o adición de uno (o más) aminoácidos de la secuencia o a la secuencia (o cualquiera de sus combinaciones), incluidas las variaciones alélicas, en comparación con la proteína natural, siempre que la proteína

resultante retenga al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99% de la actividad inmunogénica en comparación con las proteínas naturales como se usan en la presente invención. Típicamente, las variantes de los polipéptidos abarcados por la presente invención tendrán al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con respecto a la SEQ. ID. NO. 2.

La identidad de secuencia u homología se puede determinar utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, como el programa de secuencia Best Fit descrito por Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12; 387-395 (1984) o el programa BLASTX (Altschul et al., J Mol. Biol. 215, 403-410). La alineación puede incluir la introducción de huecos en las secuencias a alinear. Además, para las secuencias que contienen más o menos aminoácidos que las proteínas descritas en el presente documento, se entiende que el porcentaje de homología se determinará en función del número de aminoácidos homólogos en relación con el número total de aminoácidos.

En algunas realizaciones, las variantes o derivados de los polipéptidos de la presente invención mantienen la hidrofobicidad/hidrofilicidad de la secuencia de aminoácidos. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos conservativas, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10, 20 ó 30 sustituciones, siempre que la secuencia modificada retenga la capacidad de actuar como un inmunógeno. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos no naturales; por ejemplo, para aumentar la vida media en el plasma sanguíneo. Las sustituciones conservativas son conocidas en la técnica.

El término "derivado", como se usa en el presente documento en relación con la secuencia de aminoácidos, significa la modificación química de un polipéptido de la invención.

Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones pueden incluir, entre otros, ésteres o amidas alifáticos del extremo carboxilo o de residuos que contienen cadenas laterales carboxilo, derivados O-acilo de residuos que contienen grupos hidroxilo y derivados de N-acilo de los residuos que contienen grupos aminoácidos amino-terminales o amino; por ejemplo, lisina o arginina.

Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, la producción de un polipéptido conjugado con polietilenglicol (PEG), o la adición de PEG durante la síntesis química de un polipéptido como se describe en este documento.

Las modificaciones de los polipéptidos o sus porciones también pueden incluir la reducción/alquilación; acoplamiento químico a un vehículo adecuado o tratamiento con formalina suave.

El término "modificado", como se usa en el presente documento, se refiere a la presencia de una modificación postraduccional en un polipéptido. El término "(modificado)" significa que los polipéptidos que se están discutiendo están opcionalmente modificados; es decir, los polipéptidos en discusión pueden modificarse o no modificarse.

La expresión "modificado después de la traducción" y "modificado" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce en dicho aminoácido después de que se haya incorporado en una cadena polipeptídica. El término abarca, solo a modo de ejemplo, modificaciones in vivo co-traduccionales, modificaciones in vivo post-traduccionales, y modificaciones in vitro post-traduccionales.

Otros derivados de los polipéptidos de la presente invención incluyen la incorporación de residuos de aminoácidos no naturales, o residuos de aminoácidos fosforilados, tales como residuos de fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. Otras modificaciones potenciales incluyen la sulfonación, la biotilación o la adición de otros restos, particularmente aquellos que tienen formas moleculares similares a los grupos fosfato.

Los derivados también incluyen polipéptidos modificados por glicosilación. Estos se pueden hacer modificando los patrones de glicosilación durante la síntesis y el procesamiento en varios sistemas de expresión de huéspedes eucarióticos alternativos, o durante otras etapas de procesamiento. Los métodos para producir modificaciones de glicosilación incluyen exponer el polipéptido p62 a enzimas glicosiladas derivadas de células que normalmente llevan a cabo dicho procesamiento, como las enzimas de glicosilación de mamíferos. Alternativamente, se pueden usar enzimas de desglicosilación para eliminar los carbohidratos unidos durante la producción en sistemas de expresión eucarióticos. Además, también se puede modificar la secuencia de codificación para que se agreguen los sitios de glicosilación o se eliminen o deshabiliten los sitios de glicosilación. Además, si no se desea ninguna glicosilación, las proteínas pueden producirse en un sistema de expresión de huésped procariótico.

Las variantes y/o derivados de los polipéptidos de la invención se pueden preparar por síntesis química o mediante el uso de mutagénesis dirigida (Gillman et al., Gene 8:81 (1979); Roberts et al, Nature 328: 731 (1987) o Innis (Ed.), 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York, NY) o el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki et al, Science 239: 487 (1988)), como se ilustra por Daugherty et al (Nucleic Acids Res. 19: 2471 (1991)) para modificar los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos p62 de la invención.

- Los polipéptidos de la presente invención pueden contener una secuencia de señal heteróloga en su extremo N-terminal. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o la secreción de la proteína de fusión puede incrementarse mediante el uso de una secuencia de señal heteróloga. Las secuencias de señales se caracterizan típicamente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos, que generalmente se escinden de la proteína madura durante la secreción en uno o más eventos de escisión. Dichos péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras a medida que pasan a través de la vía secretora. Por lo tanto, la invención se refiere a los polipéptidos descritos que tienen una secuencia señal, así como a polipéptidos a partir de los cuales la secuencia señal ha sido escindida proteolíticamente (es decir, los productos de escisión).
- Con el fin de mejorar la estabilidad y/o reactividad, los polipéptidos de la presente invención también pueden modificarse para incorporar uno o más polimorfismos en la secuencia de aminoácidos que resulta de la variación alélica natural. Además, los D-aminoácidos, aminoácidos no naturales o análogos no de aminoácidos pueden sustituirse o agregarse para producir un polipéptido p62 modificado.
- Los polipéptidos de la presente invención se pueden producir mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que los codifica en un sistema de expresión adecuado.
- Además, o como alternativa, los polipéptidos pueden producirse utilizando métodos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos deseada, en su totalidad o en parte. Por ejemplo, los polipéptidos pueden sintetizarse mediante técnicas en fase sólida, escindir de la resina y purificarse mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (por ejemplo, Creighton (1983) *Proteins Structures And Molecular Principles*, WH Freeman y Co, New York N.Y.). La composición de los polipéptidos sintéticos se puede confirmar mediante análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman). Además, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido p62, o cualquiera de sus partes, puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con una secuencia de otras subunidades, o cualquiera de sus partes, para producir un polipéptido variante.
- Los ensayos para medir la actividad inmunológica de cualquier homólogo, derivado o variante de cualquier polipéptido de la presente invención son muy conocidos en la técnica.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "proteínas de fusión" se refiere a proteínas quiméricas que comprenden secuencias de aminoácidos de dos o más proteínas diferentes. Típicamente, las proteínas de fusión resultan de técnicas recombinantes in vitro muy conocidas en la técnica.
- Las proteínas de fusión de la presente invención pueden comprender además uno o más dominios polipeptídicos adicionales añadidos para facilitar la purificación de proteínas, para aumentar la expresión de la proteína recombinante, o para aumentar la solubilidad de la proteína recombinante. Dichos dominios que facilitan la purificación/expresión/solubilidad incluyen, entre otros, péptidos quelantes de metales, como los módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados (Porath J (1992) *Protein Expr Purif* 3:263-281), dominios de proteína A que permiten la purificación de inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle, Washington). La inclusión de una secuencia enlazadora escindible, como el Factor Xa o la enterocinas (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y un polipéptido p62 es útil para facilitar la purificación.
- Los vectores de expresión de fusión adicionales incluyen pGEX (Pharmacia, Piscataway, NJ), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRITS (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan la glutatión S transferasa (GST), la proteína de unión a la maltosa B, o la proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana. También se pueden utilizar EBV, BKV y otros vectores de expresión episómicos (Invitrogen).
- En ciertas realizaciones, se utiliza una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido p62. La molécula de ácido nucleico puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más polipéptidos p62, o fragmentos (que incluyen fragmentos que codifican dominios en cualquier orden o polipéptidos en los que uno o más dominios están eliminados o interrumpidos) o sus derivados, tales como los contenidos en un inserto de ADN en un depósito ATCC. La expresión "secuencia de ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a una secuencia de ADN o ARN. La expresión abarca moléculas formadas a partir de cualquiera de los análogos de bases de ADN y ARN conocidos, tales como, pero sin limitarse a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboxi-metilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-iso-penteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metil-guanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonil-metiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina, entre otros.

Los vectores se pueden usar para transferir una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido a una célula. Un vector es cualquier molécula utilizada para transferir una secuencia de ácido nucleico a una célula huésped. En ciertos casos, se utiliza un vector de expresión. Un vector de expresión es una molécula de ácido nucleico que es adecuada para la introducción y/o propagación en una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de las secuencias de ácido nucleico transferidas. La expresión incluye, pero no se limita a, procesos tales como la transcripción, la traducción y el empalme, si hay intrones presentes. Los vectores de expresión comprenden típicamente una o más secuencias flanqueantes unidas operativamente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido. Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), o sintética, por ejemplo.

Una secuencia flanqueante es preferiblemente capaz de efectuar la replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia de codificación y está unida operativamente a una secuencia de codificación. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "operativamente unido" se refiere a un enlace de elementos polinucleótidos en una relación funcional. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia de codificación. Sin embargo, una secuencia flanqueante no tiene por qué ser necesariamente contigua a la secuencia de codificación, siempre que funcione correctamente. Por lo tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias transcritas sin traducir aún intervinientes entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía puede considerarse unida operativamente a la secuencia codificante. De manera similar, una secuencia potenciadora se puede ubicar en sentido ascendente o descendente de la secuencia de codificación y afectar a la transcripción de la secuencia.

En ciertas realizaciones, se prefiere que la secuencia flanqueante sea una región reguladora de la transcripción que impulse la expresión génica de alto nivel en la célula diana. La región reguladora de la transcripción puede comprender, por ejemplo, un promotor, potenciador, silenciador, elemento represor, o sus combinaciones. La región reguladora de la transcripción puede ser constitutiva, específica del tejido, específica del tipo de célula (es decir, la región es impulsora a niveles más altos de transcripción en un tipo de tejido o célula en comparación con otro), o regulable (es decir, sensible a la interacción con una molécula). La fuente de una región reguladora de la transcripción puede ser cualquier organismo procariontico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante funcione en una célula causando la transcripción de un ácido nucleico dentro de esa célula. Se puede utilizar una amplia variedad de regiones reguladoras de la transcripción.

Las regiones reguladoras de la transcripción adecuadas incluyen, por ejemplo, el promotor de CMV (es decir, el promotor temprano inmediato de CMV); promotores de genes eucarióticos (es decir, el gen de la ovoalbúmina de pollo inducible por estrógenos, los genes de interferón, el gen de la tirosina aminotransferasa inducible por glucocorticoides y el gen de la timidina quinasa); y los principales promotores del gen del adenovirus temprano y tardío; la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' (LTR) del virus del sarcoma de Rous (RSV) (Yamamoto, et al., 1980, *Cell* 22: 787-97); el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 78: 1444-45); las secuencias reguladoras del gen de la metalotionina (Brinster et al., 1982, *Nature* 296: 39-42); vectores de expresión procarionticos tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.*, 75: 3727-31); o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.*, 80: 21-25). Las regiones de control de la transcripción específicas de tipo celular y/o de tejido incluyen, por ejemplo, la región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, *Cell* 38: 639-46; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); la región de control del gen de la insulina que es activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); la región de control del gen de la inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38: 647-58; Adames et al., 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1436-44); la región de control del virus del tumor mamario de ratón en las células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45: 485-95); la región de control del gen de la albúmina en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1: 268-76); la región de control del gen de la proteína alfa-feto en el hígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1639-48; Hammer et al., 1987, *Science* 235: 53-58); la región de control del gen de alfa 1-antitripsina en el hígado (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1: 161-71); la región de control del gen de la beta-globina en células mieloides (Mogram et al., 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias et al., 1986, *Cell* 46: 89-94); la región de control del gen de la proteína básica de la mielina en las células de oligodendrocitos en el cerebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48: 703-12); la región de control del gen de la cadena ligera-2 de la miosina en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrófica en el hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234: 1372-78) y el promotor de la tirosinasa en células de melanoma (Hart, I. *Semin Oncol* 1996 febrero; 23 (1): 154 8; Siders, et al. *Cancer Gene Ther* 1998 septiembre-octubre; 5 (5): 281-91), entre otros. También se pueden utilizar promotores inducibles que se activan en presencia de una determinada molécula o condición, como la luz, el calor, la radiación, la tetraciclina o las proteínas de choque térmico, por ejemplo (véase, por ejemplo, el documento WO 00/10612). Otros promotores adecuados son conocidos en la técnica.

Como se describió anteriormente, los potenciadores también pueden ser secuencias flanqueantes adecuadas. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, generalmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son típicamente independientes de la orientación y la posición, ya que se han identificado tanto en 5' como en 3' para secuencias de codificación controladas. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamíferos (es decir, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). De manera similar, el potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma y los potenciadores de adenovirus son útiles con secuencias promotoras eucariotas. Mientras que un potenciador puede ser empalmado en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificante de ácido nucleico, típicamente se ubica en un sitio 5' del promotor. Otros potenciadores adecuados son conocidos en la técnica y serían aplicables a la presente descripción.

En ciertas realizaciones, puede ser ventajoso combinar un polipéptido p62 o una secuencia de ácido nucleico que codifique un polipéptido p62, o su derivado con uno o más componente(s) coestimulantes, tales como proteínas de la superficie celular, citoquinas, quimiocinas o moléculas de señalización en una composición descrita en este documento. El componente coestimulador puede incluirse en la composición como un polipéptido o como un ácido nucleico que codifica el polipéptido, por ejemplo. Las moléculas coestimuladoras adecuadas incluyen, por ejemplo, polipéptidos que se unen a miembros de la familia CD28 (es decir, CD28, ICOS; Huttoff, et al. *Nature* 1999, 397: 263-265; Peach, et al. *J Exp Med* 1994, 180: 2049-2058) tales como los polipéptidos de unión a CD28 B7.1 (CD80; Schwartz, 1992; Chen et al, 1992; Ellis, et al. *J. Immunol.*, 156 (8): 2700-9) y B7.2 (CD86; Ellis, et al. *J. Immunol.*, 156 (8): 2700-9); polipéptidos que se unen a miembros de la familia integrina (es decir, LFA-1 (CD11a/CD18); Sedwick, et al. *J Immunol* 1999, 162: 1367-1375; Wulfing, et al. *Science* 1998, 282: 2266-2269; Lub, et al., *Immunol Today* 1995, 16: 479-483) incluidos los miembros de la familia ICAM (es decir, ICAM-1, -2 o -3); polipéptidos que se unen a miembros de la familia CD2 (es decir, CD2, molécula de activación de linfocitos de señalización (CDw150 o "SLAM"; Aversa, et al. *J Immunol* 1997, 158: 4036-4044) como CD58 (LFA-3; ligando CD2; Davis, et al., *Immunol Today* 1996, 17: 177-187) o ligandos de SLAM (Sayos, et al. *Nature* 1998, 395: 462-469); polipéptidos que se unen al antígeno estable al calor (HSA o CD24; Zhou, et al. *Eur J Immunol* 1997, 27: 2524-2528); polipéptidos que se unen a miembros de la familia del receptor de TNF (TNFR) (es decir, 4-1BB (CD137; Vinay, et al. *Semin Immunol* 1998, 10: 481-489), OX40 (CD134; Weinberg, et al. *Semin Immunol* 1998, 10: 471-480; Higgins, et al. *J Immunol* 1999, 162: 486-493), y CD27 (Lens, et al. *Semin Immunol* 1998, 10: 491-499)) como 4-1BBL (ligando 4-1BB; Vinay et al. *Semin Immunol* 1998, 10: 481-48; DeBenedette, et al. *J Immunol* 1997, 158: 551-559), factor 1 asociado a TNFR (TRAF-1; ligando 4-1BB; Saoulli, et al. *J Exp Med* 1998, 187: 1849-1862, Arch, et al. *Mol Cell Biol* 1998, 18: 558-565), TRAF-2 (4-1BB y ligando OX40; Saoulli, et al. *J Exp Med* 1998, 187: 1849-1862; Oshima, et al. *Int Immunol* 1998, 10: 517-526, Kawamata, et al., *J Biol Chem* 1998, 273: 5808-5814), TRAF-3 (4-1BB y ligando OX40); Arch, et al., *Mol Cell Biol* 1998, 18: 558-565; Jang, et al., *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 242: 613-620; Kawamata S, et al., *J Biol Chem* 1998, 273: 5808-5814), OX40L (ligando OX40; Gramaglia, et al. *J Immunol* 1998, 161: 6510-6517), TRAF-5 (ligando OX40; Arch, et al. *Mol Cell Biol* 1998, 18: 558-565; Kawamata, et al. *J Biol Chem* 1998, 273: 5808-5814), y CD70 (CD27, ligando; Couderc, et al. *Cancer Gene Ther.*, 5 (3): 163-75). CD154 (ligando CD40 o "CD40L"; Gurnathan, et al., *J. Immunol.*, 1998, 161: 4563-4571; Sine, et al., *Hum. Gene Ther.*, 2001, 12: 1091-1102) también puede ser adecuado.

También pueden ser componentes coestimulantes o "adyuvantes" adecuados una o más citoquinas, ya sea como polipéptidos o bien están codificados por ácidos nucleicos contenidos en las composiciones de la presente invención (Parmiani, et al. *Immunol Lett* 2000 Sep. 15; 74(1): 41-4; Berzofsky, et al. *Nature Immunol* 1: 209-219). Las citocinas adecuadas incluyen, por ejemplo, interleucina-2 (IL-2) (Rosenberg, et al. *Nature Med.* 4: 321-327 (1998)), IL-4, IL-7, IL-12 (revisado por Pardoll, 1992; Harries, et al. *J. Gene Med.* 2000 Julio-Agosto; 2 (4): 243-9; Rao, et al. *J. Immunol.* 156: 3357-3365 (1996)), IL-15 (Xin, et al. *Vaccine*, 17: 858-866, 1999), IL-16 (Cruikshank, et al. *J. Leuk Biol.* 67(6): 757-66, 2000), IL-18 (*J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001. 127(12): 718-726), GM-CSF (CSF (Disis, et al. *Blood*, 88: 202-210 (1996))), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), o interferones como el IFN- α , o INF- γ . También pueden ser adecuadas otras citocinas, como se conoce en la técnica.

También se pueden utilizar quimiocinas. Por ejemplo, se ha demostrado que las proteínas de fusión que comprenden CXCL10 (IP-10) y CCL7 (MCP-3) fusionadas a un autoantígeno tumoral inducen inmunidad antitumoral (Biragyn, et al. *Nature Biotech.* 1999, 17: 253-258). Las quimiocinas CCL3 (MIP-1 α) y CCL5 (RANTES) (Boyer, et al. *Vaccine*, 1999, 17 (Supp. 2): S53-S64) también pueden ser útiles. Otras quimiocinas adecuadas son conocidas en la técnica.

Una "molécula de señalización" es un compuesto químico biológico involucrado en la transmisión de información entre células. Dichas moléculas se liberan desde la célula enviando la señal, cruzan la brecha entre las células por difusión e interactúan con receptores específicos en otra célula, lo que desencadena una respuesta en esa célula activando una serie de reacciones controladas por enzimas que conducen a cambios dentro de la célula. Por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno es producido en pequeñas cantidades por algunas células del cuerpo humano y tiene una serie de funciones de señalización biológica. Solo ejemplos incluyen el óxido nítrico y el monóxido de carbono.

También se sabe en la técnica que los mecanismos inmunitarios supresores o reguladores negativos pueden estar bloqueados, dando como resultado respuestas inmunitarias mejoradas. Por ejemplo, el tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 (Shrikant, et al. *Immunity*, 1996, 14: 145-155; Suttmuller, et al. *J. Exp. Med.*, 2001, 194: 823-832),

anticuerpo anti-CD25 (Sutmuller, supra), anticuerpo anti-CD4 (Matsui, et al. *J. Immunol.*, 1999, 163: 184-193), la proteína de fusión IL13Ra2-Fc (Terabe, et al. *Nature Immunol.*, 2000, 1: 515-520), y sus combinaciones (es decir, anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-CD25, Sutmuller, supra) se ha demostrado que aumentan las respuestas inmunes antitumorales y sería adecuado en la práctica de la presente invención.

- 5 Cualquiera de estos componentes se puede usar solos o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, se ha demostrado que una combinación de CD80, ICAM-1 y LFA-3 ("TRICOM") puede potenciar las respuestas inmunitarias contra el cáncer (Hodge, et al. *Cancer Res.* 59: 5800-5807 (1999). Otras combinaciones efectivas incluyen, por ejemplo, IL-12 + GM-CSF (Ahlers, et al. *J. Immunol.*, 158: 3947-3958 (1997); Iwasaki, et al. *J. Immunol* 158: 4591-4601 (1997)), IL-12 + GM-CSF + TNF- α (Ahlers, et al. *Int. Immunol* 13: 897-908 (2001)), CD80 + IL-12 (Fruend, et al. *Int. J. Cancer*, 85: 508-517 (2000); Rao, et al. supra), y CD86 + GM-CSF + IL-12 (Iwasaki, supra). Cualquier experto en la técnica conocerá combinaciones adicionales útiles en la presente invención. Además, el experto en la materia estaría al tanto de reactivos o métodos adicionales que se pueden usar para modular tales mecanismos. Estos reactivos y métodos, así como otros conocidos por los expertos en la técnica, pueden utilizarse en la presente invención.
- 15 También se pueden usar otras estrategias para mejorar la eficiencia de la inmunización basada en ácidos nucleicos, incluido, por ejemplo, el uso de replicones virales autorreplicantes (Caley, et al. 1999. *Vaccine*, 17: 3124-2135; Dubensky, et al. 2000. *Mol. Med.* 6: 723-732; Leitner, et al. 2000. *Cancer Res.* 60: 51-55), optimización de codones (Liu, et al. 2000. *Mol. Ther.*, 1: 497-500; Dubensky, supra; Huang, et al. 2001. *J. Virol.* 75: 4947-4951), electroporación in vivo (Widera, et al. 2000, *J. Immunol.* 164: 4635-3640), incorporación de motivos estimulantes de CpG (Gurunathan, et al. *Ann. Rev. Immunol.*, 2000, 18: 927-974; Leitner, supra; Cho, et al. *J. Immunol* 168 (10): 4907-13), secuencias para la orientación de las vías de procesamiento de ubiquitina o endocítica (Thomson, et al. 1998, *J. Virol.* 72: 2246-2252; Velders, et al. 2001, *J. Immunol* 166: 5366-5373), secuencias VP22 del virus de la enfermedad de Marek tipo 1 (*J. Virol.* 76 (6): 2676-82, 2002), regímenes de estimulación primaria (Gurunathan, supra; Sullivan, et al. 2000, *Nature*, 408: 605-609; Hanke, et al. 1998, *Vaccine*, 16: 439-445; Amara, et al. 2001, *Science*, 292: 69-74), y el uso de vectores de administración de la mucosa como *Salmonella* (Darji, et al. 1997. *Cell*, 91: 765-775; Woo, et al. 2001, *Vaccine*, 19: 2945-2954). Otros métodos son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación.

- Los agentes quimioterapéuticos, la radiación, las moléculas antiangiogénicas u otros agentes también pueden utilizarse para tratar y/o prevenir el cáncer usando polipéptidos p62 o ácidos nucleicos que codifican p62 (Sebti, et al. *Oncogene* 2000 Dec. 27; 19(56):6566-73). Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de mama metastásico, los agentes quimioterapéuticos útiles incluyen ciclofosfamida, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, navelbina, capecitabina y mitomicina C, entre otros. Los regímenes quimioterapéuticos combinados también han demostrado ser efectivos, incluyendo ciclofosfamida + metotrexato + 5-fluorouracilo; ciclofosfamida + doxorubicina + 5-fluorouracilo; o, ciclofosfamida + doxorubicina, por ejemplo. Se han utilizado otros compuestos tales como la prednisona, un taxano, navelbina, mitomicina C o vinblastina por varias razones. La mayoría de los pacientes con cáncer de mama tienen tumores con receptores de estrógeno positivos (ER+) y en estos pacientes, se prefiere la terapia endocrina (es decir, el tamoxifeno) frente a la quimioterapia. Para tales pacientes, se prefiere el tamoxifeno o, como terapia de segunda línea, las progestinas (acetato de medroxiprogesterona o acetato de megestrol). Los inhibidores de la aromatasa (es decir, la aminoglutetimida y sus análogos, como el letrozol) disminuyen la disponibilidad de estrógenos necesarios para mantener el crecimiento del tumor y se pueden usar como terapia endocrina de segunda o tercera línea en ciertos pacientes.

- Otros cánceres pueden requerir diferentes regímenes quimioterapéuticos. Por ejemplo, el cáncer colorrectal metastásico suele tratarse con Camptosar (irinotecan o CPT-11), 5-fluorouracilo o leucovorina, solos o en combinación entre sí. Los inhibidores de proteinasas y de integrina, como los inhibidores de la MMP marimastata (British Biotech), COL-3 (Collagenex), Neovastat (Aeterna), AG3340 (Agouron), BMS-275291 (Bristol Myers Squibb), CGS 27023A (Novartis) o los inhibidores de integrina Vitaxin (Medimmune), o MED1522 (Merck KgaA) también puede ser adecuado para su uso. Como tal, la selección inmunológica de dianas inmunogénicas asociadas con el cáncer colorrectal se podría realizar en combinación con un tratamiento utilizando esos agentes quimioterapéuticos. De manera similar, los agentes quimioterapéuticos usados para tratar otros tipos de cáncer son bien conocidos en la técnica y pueden combinarse con las dianas inmunogénicas descritas en este documento.

- Muchos agentes antiangiogénicos son conocidos en la técnica y serían adecuados para la administración conjunta con el ácido nucleico p62 o las vacunas de polipéptidos (ver, por ejemplo, Timar, et al. 2001. *Pathology Oncol. Res.*, 7 (2): 85-94). Tales agentes incluyen, por ejemplo, agentes fisiológicos tales como factores de crecimiento (es decir, ANG-2, NK1, 2, 4 (HGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)), citoquinas (es decir, interferones tales como IFN- α , - β , - γ , factor plaquetario 4 (PF-4), PR-39), proteasas (es decir, AT-III escindido, fragmento de colágeno XVIII (endostatina)), fragmento de plasmina HmwKallikrein-d5 (angiostatina), protrombina-F1-2, TSP-1), inhibidores de proteasa (es decir, inhibidores tisulares de metaloproteasas como TIMP-1, -2 o -3; maspin; activadores-inhibidores de plasminógeno tales como PAI-1; factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF)), Tumstatina (disponible a través de ILEX, Inc.), productos de anticuerpos (es decir, los anticuerpos de unión a colágeno HUIV26, HUI77, XL313; anti-VEGF; anti-integrina (es decir, Vitaxin, (Lxsys))) y glicosidasas (es decir, heparinasa-I, -III). Las moléculas que son antagonistas de los antígenos asociados a la angiogénesis (incluidas las proteínas y los polipéptidos) también son adecuadas y pueden incluir, pero no se limitan a, moléculas dirigidas contra VEGF,

receptor de VEGF, EGFR, bFGF, PDGF-B, PD-ECGF, TGF incluidos TGF- α , endoglina, proteínas Id, diversas proteasas, óxido nítrico sintasa, aminopeptidasa, trombospondinas, k-ras, Wnt, quinasas dependientes de ciclina, microtúbulos, proteínas de choque térmico, factores de unión a heparina, sintasas, receptores de colágeno, integrinas, y proteoglicano de superficie NG2. Los agentes "químicos" o fisiológicos modificados que se sabe o se cree que tienen potencial anti-angiogénico incluyen, por ejemplo, vinblastina, taxol, ketoconazol, talidomida, dolestatina, combrestatina A, rapamicina (Guba, et al. 2002, *Nature Med.*, 8: 128-135), CEP-7055 (disponible en Cephalon, Inc.), flavona ácido acético, Bay 12-9566 (Bayer Corp.), AG3340 (Agouron, Inc.), CGS. 27023A (Novartis), derivados de tetraciclina (es decir, COL-3 (Collagenix, Inc.)), Neovastat (Aeterna), BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb), dosis baja 5-FU, dosis baja de metotrexato (MTX), irsofladina, radicicol, ciclosporina, captopril, celecoxib, polisacárido sulfatado D45152, proteína catiónica (protamina), péptido catiónico-VEGF, suramina (naftil urea polisulfonada), compuestos que interfieren con la función o producción de VEGF (es decir, SU5416 o SU686)), PTK787/ZK22584 (Novartis), Distamicina A, Angiozima (ribozima), isoflavonoides, derivados de estaurosporina, genisteína, EMD121974 (Merck KcgaA), tirfostinas, isoquinolonas, ácido retinoico, carboxiamidotriazol, TNP-470, octreótido, 2-metoxiestradiol, aminosteroides (es decir, escualamina), análogos de glutatión (es decir, N-acetil-L-cisteína), combretastatina A-4 (Oxigene), agentes bloqueadores del receptor Eph (*Nature*, 414: 933-938, 2001), Rh-angiostatina, Rh-Endostatina (documento WO 01/93897), péptido RGD cíclico, acutina-desintegrina, benzodiazepenos, anticuerpo anti-avb3 humanizado, Rh-PAI-2, amilorida, p-amidobenzamidina, anticuerpo anti-uPA, anticuerpo anti-uPAR, L-fenilalanina-N-metilamidas (es decir, Batimistat, Marimastat), AG3340 y minociclina. Muchos otros agentes adecuados son conocidos en la técnica.

También puede utilizarse en combinación con métodos "no tradicionales" para tratar el cáncer. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de ciertas bacterias anaeróbicas puede ayudar a retardar el crecimiento del tumor. En un estudio, se modificó *Clostridium novyi* para eliminar un gen de toxina en un episoma de fago y se administró a ratones con tumores colorrectales (Dang, et al. *P.N.A.S. USA*, 98 (26): 15155-15160, 2001). En combinación con la quimioterapia, se demostró que el tratamiento causaba necrosis tumoral en los animales. Los reactivos y metodologías descritos en esta solicitud pueden combinarse con dichas metodologías de tratamiento.

Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos p62 pueden administrarse a los pacientes por cualquiera de las diversas técnicas disponibles. Diversos vectores virales que se han utilizado con éxito para introducir ácidos nucleicos en huéspedes incluyen retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes y virus de la viruela, entre otros. Se entiende en la técnica que muchos de estos vectores virales están disponibles en la técnica. Los vectores de la presente invención pueden construirse usando técnicas recombinantes estándar ampliamente disponibles para los expertos en la técnica. Dichas técnicas se pueden encontrar en referencias comunes de biología molecular, como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, Calif.)*, and *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.).

Los vectores retrovirales adecuados incluyen derivados de lentivirus así como derivados de retrovirus murinos o aviares. Los ejemplos de vectores retrovirales adecuados incluyen, por ejemplo, virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), SIV, BIV, VIH y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales pueden incorporar múltiples secuencias de ácido nucleico exógenas. Como los retrovirus recombinantes son defectuosos, requieren asistencia para producir partículas de vectores infecciosas. Esta asistencia puede ser proporcionada, por ejemplo, por líneas celulares auxiliares que codifican genes estructurales de retrovirus. Las líneas de células auxiliares adecuadas incluyen PSI.2, PA317 y PA12, entre otras. Los viriones vectoriales producidos utilizando dichas líneas celulares pueden usarse luego para infectar una línea celular de tejido, como las células NIH 3T3, para producir grandes cantidades de viriones retrovirales quiméricos. Los vectores retrovirales pueden administrarse mediante métodos tradicionales (es decir, inyección) o mediante la implantación de una "línea celular productora" cerca de la población de células diana (Culver, K., et al., 1994, *Hum. Gene Ther.*, 5 (3): 343-79; Culver, K., et al., *Cold Spring Harb. Symp; Quant. Biol.*, 59: 685-90; Oldfield, E., 1993, *Hum. Gene Ther.*, 4 (1): 39-69). La línea celular productora está diseñada para producir un vector viral y libera partículas virales cerca de la célula objetivo. Una porción de las partículas virales liberadas se ponen en contacto con las células diana e infectan esas células, administrado por lo tanto un ácido nucleico de la presente invención a la célula diana. Tras la infección de la célula diana, se produce la expresión del ácido nucleico del vector.

Los vectores adenovirales han demostrado ser especialmente útiles para la transferencia de genes a células eucariotas (Rosenfeld, M., et al., 1991, *Science*, 252 (5004): 431-4; Crystal, R., et al., 1994, *Nat. Genet.*, 8 (1): 42-51), el estudio de la expresión de genes eucarióticos (Levrero, M., et al., 1991, *Gene*, 101 (2): 195-202), el desarrollo de vacunas (Graham, F. y Prevec, L., 1992, *Biotechnology*, 20: 363-90), y en modelos animales (Stratford-Perricaudet, L., et al., 1992, *Bone Marrow Transplant.*, 9 (Suppl. 1): 151-2; Rich, D., et al., 1993, *Hum. Gene Ther.*, 4 (4): 461-76). Las rutas experimentales para administrar adenovirus recombinantes a diferentes tejidos in vivo han incluido la instilación intratraqueal (Rosenfeld, M., et al., 1992, *Cell*, 68 (1): 143-55), la inyección en el músculo (Quantin, B., et al. 1992, *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.*, 89 (7): 2581-4), la inyección intravenosa periférica (Herz, J., y Gerard, R., 1993, *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.*, 90 (7): 2812-6) y la inoculación estereotáctica al cerebro (Le Gal La Salle, G., et al., 1993, *Science*, 259 (5097): 988-90), entre otros.

El virus adenoasociado (AAV) demuestra infectividad de alto nivel, un amplio rango de hospedadores y especificidad en la integración en el genoma de la célula hospedadora (Hermonat, P., et al., 1984, Proc. Natl Acad Sci. U.S.A., 81 (20): 6466-70). Y el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) es otro sistema vectorial atractivo, especialmente para su uso en el sistema nervioso debido a su propiedad neurotrópica (Geller, A., et al., 1991, Trends Neurosci., 14 (10): 428-32; Glorioso, et al., 1995, Mol. Biotechnol., 4 (1): 87-99; Glorioso, et al., 1995, Annu. Rev. Microbiol., 49: 675-710).

El virus de la viruela es otro vector de expresión útil (Smith, et al. 1983, Gene, 25 (1): 21-8; Moss, et al, 1992, Biotechnology, 20: 345-62; Moss, et al, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 25-38; Moss, et al. 1991. Science, 252: 1662-1667). Los virus de la viruela que se muestran útiles incluyen vaccinia, NYVAC, viruela aviar, difteria aviar, viruela del canario, ALVAC y ALVAC (2), entre otros.

NYVAC (vP866) se derivó de la cepa de vacuna de Copenhague del virus vaccinia al eliminar seis regiones no esenciales del genoma que codificaban factores de virulencia conocidos o potenciales (ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Números 5.364.773 y 5.494.807). Los loci de eliminación también se diseñaron como loci receptores para la inserción de genes ajenos. Las regiones eliminadas son: el gen de la timidina quinasa (TK; J2R); la región hemorrágica (u; B13R + B14R); la región del cuerpo de inclusión tipo A (ATI; A26L); el gen de la hemaglutinina (HA; A56R); la región del gen del rango del huésped (C7L-K1L); y la ribonucleótido reductasa, subunidad grande, (I4L). NYVAC es una cepa del virus vaccinia diseñada por ingeniería genética que se generó mediante la eliminación específica de dieciocho marcos de lectura abiertos que codificaban los productos genéticos asociados con la virulencia y el rango del huésped. Se ha demostrado que NYVAC es útil para la expresión de TA (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.265.189). NYVAC (vP866), vP994, vCP205, vCP1433, placZH6H4Lreverse, pMPC6H6K3E3 y pC3H6FHVB también fueron depositados en el ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, números de entrada VR-2559, VR-2558, VR-2557, VR-2556, ATCC-97913, ATCC-97912 y ATCC-97914, respectivamente.

Los virus recombinantes basados en ALVAC (es decir, ALVAC-1 y ALVAC-2) también son adecuados para su uso en la práctica de la presente invención (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.756.103). ALVAC (2) es idéntico a ALVAC (1), excepto que el genoma de ALVAC (2) comprende los genes E3L y K3L de vaccinia bajo el control de los promotores de la vacuna (Patente de Estados Unidos N° 6.130.066; Beattie et al., 1995a, 1995b, 1991; Chang et al., 1992; Davies et al., 1993). Se ha demostrado que tanto ALVAC (1) como ALVAC (2) son útiles para expresar secuencias de ADN ajenas, tales como TA (Tartaglia et al., 1993 a, b; Patente de Estados Unidos N° 5.833.975). ALVAC se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EE. UU., Número de entrada ATCC VR-2547.

Otro vector del virus de la viruela útil es el TROVAC. El TROVAC se refiere a una viruela aviar atenuada que fue un aislado clonado en placa derivado de la cepa de vacuna FP-1 de la viruela aviar que está autorizada para la vacunación de pollitos de 1 día. TROVAC también se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest con la ATCC, número de acceso 2553.

Los vectores plasmídicos "no virales" también pueden ser adecuados. Los vectores plasmídicos adecuados son compatibles con células huésped bacterianas, de insectos y/o de mamíferos. Tales vectores incluyen, por ejemplo, PCR-II, pCR3 y pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, California), pBSII (Stratagene, La Jolla, California), pET15 (Novagen, Madison, Wisconsin), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, California), pETL (BlueBacll, Invitrogen), pDSR-alfa (publicación PCT No. WO 90/14363) y pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY), así como derivados plásmidos Bluescript® (un fagémido basado en COLE1 de alto número de copias, Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif.), plásmidos para la clonación por PCR diseñados para clonar productos de la PCR amplificados con Taq (p. ej., el kit TOPO™ TA Cloning®, derivados plasmídicos de PCR2.1®, Invitrogen, Carlsbad, California). También se pueden usar vectores bacterianos. Estos vectores incluyen, por ejemplo, Shigella, Salmonella, Vibrio cholerae, Lactobacillus, Bacille calmette guerin (BCG) y Streptococcus (véase, por ejemplo, los documentos WO 88/6626; WO 90/0594; WO 91/13157; WO 92/1796; y WO 92/21376). Muchos otros vectores y sistemas de expresión de plásmidos no virales son conocidos en la técnica y podrían usarse.

Las técnicas de administración de ácidos nucleicos adecuadas incluyen complejos de ADN-ligando, complejos de adenovirus-ligando-ADN, inyección directa de ADN, precipitación con CaPO₄, técnicas con pistolas de genes, electroporación y sistemas de dispersión coloidal, entre otros. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido es un liposoma, que son vesículas de membranas artificiales útiles como vehículos de administración in vitro e in vivo. El ARN, el ADN y los viriones intactos se pueden encapsular dentro del interior acuoso y administrarse a las células en una forma biológicamente activa (Fraley, R., et al., 1981, Trends Biochem. Sci., 6: 77). La composición del liposoma es generalmente una combinación de fosfolípidos, particularmente fosfolípidos con altas temperaturas de transición de fase, generalmente en combinación con esteroides, especialmente con colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidos y gangliósidos. Particularmente útiles son los diacilfosfatidilgliceroles, donde el resto lipídico contiene

de 14 a 18 átomos de carbono, particularmente de 16 a 18 átomos de carbono, y está saturado. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y distearoilfosfatidilcolina.

También se puede administrar una diana inmunogénica en combinación con uno o más adyuvantes para estimular la respuesta inmune. Los adyuvantes ejemplares se muestran en la Tabla 3 a continuación:

5 Tabla 3. Tipos de adyuvantes inmunológicos

Tipo de adyuvante	Ejemplos generales	Ejemplos específicos/referencias
Tipo de gel	Hidróxido de aluminio/fosfato ("adyuvantes de alumbre")	(Aggerbeck and Heron, 1995)
	fosfato de calcio	(Relyveld, 1986)
Microbiano	Dipéptido de Muramil (MDP)	(Chedid et al., 1986)
	Exotoxinas bacterianas	Toxina del cólera (CT), toxina lábil de E. coli (LT) (Freitag y Clements, 1999) I
	Adyuvantes a base de endotoxinas	lípidos A de monofosforilo (MPL) (Ulrich y Myers, 1995)
	Otros agentes bacterianos	oligonucleótidos CpG (Corral y Petray, 2000), secuencias de BCG (Krieg, et al. Nature, 374: 576), toxoide tetánico (Rice, et al. J. Immunol., 2001, 167: 1558-1565)
Partículas	Biodegradable	(Gupta et al., 1998)
	Microesferas de polímero	
	Complejos inmunoestimuladores (ISCOM)	(Morein y Bengtsson, 1999)
	liposomas	(Wassef et al., 1994)
adyuvantes basados en emulsiones de aceite y tensioactivos	Adyuvante incompleto de Freund	(Jensen et al., 1998)
	Emulsiones microfluidizadas	MF59 (Ott et al., 1995)
		SAF (Allison y Byars, 1992) (Allison, 1999)
Saponinas	QS-21 (Kensil, 1996)	
Sintéticos	Derivados del péptido de muramilo	Murabutida (Lederer, 1986), Threony-MDP (Allison, 1997)
	Copolímeros de bloque no iónico	L121 (Allison, 1999)
	Polifosfazeno (PCPP)	(Payne et al., 1995)
	Polinucleótidos sintéticos	Poli A: U, Poly I: C (Johnson, 1994)
	Derivados de la talidomida	CC-4047/ACTIMID (J. Immunol., 168 (10): 4914-9)

10

En algunas realizaciones, los polipéptidos p62 o los ácidos nucleicos que codifican p62 de acuerdo con la presente invención se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar, aplacar, retrasar el inicio (profilaxis), inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, los polipéptidos p62 o los ácidos nucleicos que codifican p62 se pueden usar para tratar tumores sólidos, por ejemplo, cáncer y/o células cancerosas. El término "cáncer" incluye cánceres premalignos y malignos. Los cánceres incluyen, entre otros, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de piel, por ejemplo, melanomas o carcinomas de células basales, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino, cánceres de cabeza y cuello, cáncer bronquial, cáncer de páncreas, cáncer de

vejiga urinaria, cáncer de cerebro o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículo, cáncer del tracto biliar, cáncer del intestino delgado o del apéndice, cáncer de la glándula salival, cáncer de tiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma, cáncer de tejidos hematológicos y similares. Las "células cancerosas" pueden estar en forma de un tumor, pueden existir solas dentro de un sujeto (por ejemplo, células de leucemia o ascitis), o pueden ser líneas celulares derivadas de un cáncer.

El cáncer puede estar asociado con una variedad de síntomas físicos. Los síntomas del cáncer generalmente dependen del tipo y la ubicación del tumor. Por ejemplo, el cáncer de pulmón puede causar tos, dificultad para respirar y dolor en el pecho, mientras que el cáncer de colon a menudo causa diarrea, estreñimiento y sangre en las heces. Sin embargo, para dar solo algunos ejemplos, los siguientes síntomas generalmente se asocian con muchos tipos de cáncer: fiebre, escalofríos, sudores nocturnos, tos, disnea, pérdida de peso, pérdida de apetito, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, anemia, ictericia, hepatomegalia, hemoptisis, fatiga, malestar, disfunción cognitiva, depresión, trastornos hormonales, neutropenia, dolor, úlceras no cicatrizadas, ganglios linfáticos agrandados, neuropatía periférica y disfunción sexual.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, el cáncer de próstata o de mama). En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptidos p62 o p62 que codifican ácidos nucleicos a un sujeto que lo necesite, en tales cantidades y durante el tiempo que sea necesario para lograr el resultado deseado. En ciertas realizaciones, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una partícula dirigida es aquella cantidad efectiva para tratar, aliviar, mejorar, paliar, retrasar la aparición, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para administrar polipéptidos p62 o p62 que codifican ácidos nucleicos a un sujeto que padece cáncer (por ejemplo, cáncer de mama) o una recaída. En algunas realizaciones, los polipéptidos p62 o los ácidos nucleicos que codifican p62 se administran a un sujeto en tales cantidades y durante el tiempo que sea necesario para lograr el resultado deseado (es decir, el tratamiento del cáncer). En ciertas realizaciones, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de polipéptidos p62 y ácidos nucleicos que codifican p62 es aquella cantidad eficaz para tratar, aliviar, mejorar, paliar, retrasar la aparición, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características del cáncer. En algunas realizaciones, los polipéptidos p62 o los ácidos nucleicos que codifican p62 de la invención se administran a un sujeto tratado previamente por cáncer. En algunas realizaciones, los polipéptidos p62 o los ácidos nucleicos que codifican p62 de la invención se administran a un sujeto con antecedentes familiares de cáncer. En algunas realizaciones, los polipéptidos p62 o los ácidos nucleicos que codifican p62 de la invención se administran a un sujeto con una cierta predisposición para el cáncer. Por ejemplo, un sujeto que es BRCA positivo está genéticamente predispuesto a ciertas formas de cáncer de mama.

Los protocolos terapéuticos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de polipéptidos p62 o ácidos nucleicos que codifican p62 a un individuo sano (es decir, un sujeto que no presenta ningún síntoma de cáncer y/o que no ha sido diagnosticado con cáncer). Por ejemplo, los individuos sanos pueden ser "inmunizados" con polipéptidos p62 o ácidos nucleicos que codifican p62 antes del desarrollo del cáncer y/o la aparición de síntomas de cáncer; individuos en riesgo (por ejemplo, pacientes con antecedentes familiares de cáncer; pacientes con una o más mutaciones genéticas asociadas con el desarrollo del cáncer; pacientes con un polimorfismo genético asociado con el desarrollo del cáncer; pacientes infectados por un virus asociado con el desarrollo del cáncer; los pacientes con hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de cáncer; etc.) pueden tratarse de manera sustancialmente contemporánea (p. ej., dentro de las 48 horas, dentro de las 24 horas o dentro de las 12 horas de la aparición de los síntomas del cáncer). Por supuesto, las personas que se sabe que tienen cáncer pueden recibir un tratamiento innovador en cualquier momento.

En otras realizaciones, los polipéptidos p62 o los ácidos nucleicos que codifican p62 de la presente invención se pueden usar para inhibir el crecimiento de células cancerosas, por ejemplo, células de cáncer de mama. Como se usa en este documento, la expresión "inhibe el crecimiento de células cancerosas" o "que inhibe el crecimiento de células cancerosas" se refiere a cualquier desaceleración de la tasa de proliferación y/o migración de células cancerosas, la detención de la proliferación y/o migración de células cancerosas, o la muerte de células cancerosas, de manera que la tasa de crecimiento de las células cancerosas se reduce en comparación con la tasa observada o predicha de crecimiento de una célula cancerosa de control no tratada. La expresión "inhibe el crecimiento" también puede referirse a una reducción en el tamaño o la desaparición de una célula cancerosa o tumor, así como a una reducción en su potencial metastásico. Preferiblemente, tal inhibición a nivel celular puede reducir el tamaño, detener el crecimiento, reducir la agresividad, o prevenir o inhibir la metástasis de un cáncer en un paciente. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente, mediante cualquiera de una variedad de indicios adecuados, si se inhibe el crecimiento de las células cancerosas.

La inhibición del crecimiento de las células cancerosas se puede evidenciar, por ejemplo, mediante la detención de células cancerosas en una fase particular del ciclo celular, por ejemplo, la detención en la fase G2/M del ciclo celular. La inhibición del crecimiento de células cancerosas también puede evidenciarse por medición directa o indirecta de las células cancerosas o del tamaño del tumor. En pacientes humanos con cáncer, tales mediciones

5 generalmente se realizan utilizando métodos de imagen bien conocidos, como la resonancia magnética, la tomografía axial computarizada y los rayos X. El crecimiento de las células cancerosas también se puede determinar indirectamente, por ejemplo, al determinar los niveles de antígeno carcinoembrionario circulante, antígeno específico de la próstata u otros antígenos específicos del cáncer que se correlacionan con el crecimiento de las células cancerosas. La inhibición del crecimiento del cáncer también se correlación generalmente con una supervivencia prolongada y/o mayor salud y bienestar del sujeto.

10 Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse como un producto farmacéutico o un medicamento formulado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, los compuestos y las composiciones pueden usarse en la fabricación de un medicamento o una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse como soluciones o polvos liofilizados para la administración parenteral. Los polvos pueden reconstituirse mediante la adición de un diluyente adecuado u otro vehículo farmacéuticamente aceptable antes de su uso. Las formulaciones líquidas pueden ser soluciones tamponadas, isotónicas, acuosas. Los polvos también se pueden rociar en forma seca. Ejemplos de diluyentes adecuados son solución salina isotónica normal, dextrosa estándar al 5% en agua o solución de acetato de sodio o amonio tamponada. Dichas formulaciones son especialmente adecuadas para la administración parenteral, pero también pueden usarse para la administración oral o estar contenidas en un inhalador de dosis medida o nebulizador para insuflación. Puede ser deseable agregar excipientes tales como polivinilpirrolidona, gelatina, hidroxil celulosa, acacia, polietilenglicol, manitol, cloruro de sodio, citrato de sodio y similares.

20 Alternativamente, los compuestos y las composiciones pueden encapsularse, comprimirse o prepararse en una emulsión o jarabe para la administración oral. Se pueden añadir vehículos sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para mejorar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio dihidratado, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, acacia, agar o gelatina. Los vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de maní, aceite de oliva, solución salina y agua. El vehículo también puede incluir un material de liberación sostenida tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera. La cantidad de vehículo sólido varía pero, preferiblemente, estará entre aproximadamente 20 mg y aproximadamente 1 g por unidad de dosificación. Las preparaciones farmacéuticas se realizan siguiendo las técnicas convencionales de farmacia que incluyen moler, mezclar, granular y comprimir, cuando sea necesario, para formas en tabletas; o molienda, mezcla y relleno para formas en cápsulas de gelatina dura. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación puede estar en la forma de un jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Para la administración rectal, los compuestos de la invención pueden combinarse con excipientes tales como manteca de cacao, glicerina, gelatina o polietilenglicoles y moldearse en un supositorio.

35 Los compuestos y composiciones pueden formularse para incluir otros fármacos o agentes biológicos de utilidad médica. Los compuestos y composiciones también pueden administrarse junto con la administración de otros fármacos o agentes biológicos útiles para la enfermedad o afección a la que se dirigen los compuestos y composiciones de la invención.

40 Tal como se emplea en el presente documento, la frase "una cantidad eficaz" se refiere a una dosis suficiente para proporcionar concentraciones lo suficientemente altas para impartir un efecto beneficioso en el receptor de ésta. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando, la gravedad del trastorno, la actividad del compuesto o composición específica, la vía de administración, la velocidad de eliminación del compuesto o la composición, la duración del tratamiento, los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto o la composición, la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta y la salud general del sujeto, y factores similares bien conocidos en las artes y las ciencias médicas. Los expertos en la técnica conocen varias consideraciones generales que se tienen en cuenta para determinar la "cantidad terapéuticamente efectiva" y se describen, por ejemplo, en Gilman et al., Eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press, 1990; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1990. Los niveles de dosificación generalmente se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0,001 hasta 100 mg/kg/día; con niveles en el intervalo de aproximadamente 0,05 hasta 10 mg/kg/día son generalmente aplicables. Un compuesto o composición puede administrarse por vía parenteral, tal como intravascular, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraocular, intradérmica, subcutánea o similar. La administración también puede ser oral, nasal, rectal, transdérmica, intravaginal o inhalatoria a través de un aerosol. Se puede administrar un compuesto o una composición al órgano que tiene el tumor (o al objetivo potencial del tumor) o al tumor mismo. El compuesto o la composición puede administrarse como un bolo o infundirse lentamente, o administrarse como una inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

60 Una dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular determinando un nivel de expresión de p62 tras la introducción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido p62. Luego se puede formular una dosis en modelos animales para lograr una respuesta inmune adecuada y/o protección contra el crecimiento del tumor. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis iniciales útiles en humanos. El propio médico puede elegir la formulación exacta, la vía de administración y la dosis en función del estado del paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Líneas celulares y construcción de vectores

5 Una línea celular de tumor de mama 233-VSGA1, que sobreexpresa el oncogén HER/2 neu de rata activado, se derivó de un carcinoma mamario de ratón que surge en ratones transgénicos FVB/neu NT. Esta línea celular se mantuvo como se describe (Nanni P, Pupa S M, Nicoletti G y otros, Int J Cancer 2000; 87: 186). Las células HeLa (ATCC # CCL-2.2 TM) se propagaron en medio de crecimiento completo ATCC (ATCC MD-6108).

10 El dominio extracelular de HER2/neu de rata se amplificó por PCR y se clonó en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen) como se describe (F M Venanzi, A Barucca, K Havas, M Capitani, M Provinciali S Scotti, A Concetti. Vaccine 2010 (22); 3841-7).

15 Como fuente de cDNA que codifica p62, se extrajo el RNA total de las células HeLa. El ADNc de longitud completa que codifica la isoforma más larga de p62 (Variante de Transcripción 1, número de referencia de GenBank NP — 003891) se amplificó mediante PCR (HotStar HiFidelity Polymerase Kit Qiagen) utilizando los siguientes cebadores: FW: 5-CCCCTAGCATGGCGTCGCTCACCGTG-3 and REV: 5'-CCCAAGCTTTCACAACGGCGGGGGATGCTTTG-3'. Los productos de la PCR se purificaron y los fragmentos digeridos con Nhe I-Hind III se clonaron en pcDNA3.1.

Las secuencias del ADN de p62 insertado se confirmaron mediante secuenciación (MGWBiotech/M-medical, Martinsried, Alemania). Se observó que el polipéptido codificado difería de la secuencia de aminoácidos natural por dos mutaciones de sustitución: C145R y Q418R.

Ejemplo 2. Efecto antitumoral preventivo de la inmunización p62 en un modelo de cáncer de mama en ratón

20 Los ratones FVB/N se dividieron en tres grupos (15 ratones por grupo) y se inmunizaron con:

1. pcDNA.3.1 (vector de plásmido vacío, control negativo);
2. pcDNA.3.1 con pHER2 (control positivo); o,
3. pcDNA.3.1 con p62 (experimento).

25 Se anestesiaron hembras FVB/N y, después de la exposición del cuadriceps femoral, se inyectaron 100 µg de ADN (1 mg/mL) en solución salina con una jeringa de insulina. Los ratones se inmunizaron dos veces (a las 4 y 2 semanas antes de la exposición al tumor). Los ratones fueron estimulados intradérmicamente con 3×10^5 células tumorales 233-VSGA1/100 µl de tampón PBS en la extremidad. En todos los casos, los tumores se midieron determinando dos diámetros perpendiculares con un calibrador tres veces a la semana. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor se ulceró o alcanzó 1 cm en cualquier diámetro.

30 El 100% de los ratones vacunados con un vector de plásmido vacío (control negativo) desarrollaron tumores el día 13 después de la exposición. La vacunación con plásmido codificante de HER2 dio una protección del 40% (Figura 4). Al mismo tiempo, el plásmido que codificaba p62 demostró una protección del 100% el día 13, que se redujo gradualmente al 70%. En consecuencia, se demostró el efecto protector del plásmido que codificaba p62 en un modelo de ratón de cáncer de mama transplantable. Por lo tanto, el efecto preventivo de la vacuna p62 se demostró para el cáncer de mama en un modelo de ratón. Los inventores plantean la hipótesis de que se podría mantener una protección del 100% si se continuaran las vacunas.

35 A los animales que se inmunizaron con un vector plasmídico que codificaba HER2 o p62 y no desarrollaron tumores después de la primera prueba de células cancerosas se les administraron la misma cantidad de células cancerosas en el día 50. Todos los animales vacunados con plásmido codificante de HER2 desarrollaron tumores, mientras que no aparecieron tumores en animales vacunados con p62. En consecuencia, la inmunización con p62 mantuvo la memoria inmunológica, mientras que HER2 no lo hizo.

Ejemplo 3. La vacuna p62 estimula la inmunidad innata

Los tumores en los ratones que recibieron la vacuna p62 contenían grandes zonas de necrosis (Figura 5). Las células inmunes asociadas con la inflamación están abundantemente presentes dentro de las áreas necróticas.

45 La vacuna HER2 provoca respuesta inmune adaptativa específica de antígeno y migración masiva de linfocitos (células CD3+, linfocitos infiltrantes de tumores) en el tumor (Figura 6). Al mismo tiempo, la vacunación con plásmido p62 no aumentó significativamente el nivel de linfocitos infiltrantes de tumores. Por el contrario, la inyección del plásmido p62, pero no la vacuna HER2, aumentó el nivel de células CD11B+ en el tumor (Figura 6). En consecuencia, la vacuna p62 actúa a través de la estimulación de la inmunidad innata, a diferencia de la vacuna HER2.

50

Ejemplo 4. Demostración de la actividad antitumoral de la vacuna de ADN p62 en el modelo de cáncer de mama en rata T5

El cáncer de mama de rata transplantable T5 se derivó de un adenocarcinoma espontáneo de glándula mamaria de una rata Wistar en R.E. Instituto Kavetsky de Patología Experimental, Oncología y Radiobiología de la Academia Nacional de Ciencias de Ucrania. Ratas Wistar hembras de dos meses de edad (peso: 130-150 g, 10 animales por grupo) se expusieron con carcinoma de glándula mamaria de rata T5 mediante inyección subcutánea de $2,5 \times 10^6$ células tumorales/rata en 0,4 ml de PBS. Comenzando al día siguiente después del trasplante de tumor, las ratas se vacunaron tres veces una vez a la semana (Figura 7). Cada inyección contenía 78 μ g de pcDNA.3.1 (vector de plásmido vacío, control negativo) o pcDNA.3.1 con p62 (experimento).

El crecimiento tumoral se inhibió mediante la inmunización con p62 (Figura 8) con una inhibición del 70% del crecimiento tumoral en ratas vacunadas con p62 en comparación con ratas de control inyectadas con vector (p <0,004) (Figura 9).

La supervivencia de las ratas implantadas en el tumor (8 inmunizadas con vector y 8 inmunizadas con p62) se controló durante 75 días. El 50% de los animales en el grupo de control murió mientras no hubo muertes de animales en el grupo vacunado con p62 (FIG. 10).

El análisis histológico de los tumores reveló zonas necróticas (figura 11). La necrosis intratumoral en ratas que recibieron la vacuna de ADN p62 fue similar a la observada en los tumores de ratones que recibieron la vacuna de ADN p62 (Figura 12).

En consecuencia, el efecto antitumoral de la vacuna de ADN p62 se demostró en el segundo modelo animal (rata), lo que indica que la vacuna de ADN p62 se puede usar para tratar el cáncer de mama.

Ejemplo 5. Potencia antimetastásica de la vacuna de ADN p62

El carcinoma de pulmón de Lewis es un modelo aceptado oficialmente por el Comité Farmacológico de la Federación Rusa, "FDA de Rusia", para probar los medicamentos para detectar efectos antimetastásicos. Se inyectaron 100 μ g de plásmido por vía intramuscular en cada ratón 4 semanas y 2 semanas antes de la exposición con trasplante de tumor, así como 1, 8 y 15 días después de la exposición. Se utilizaron quince animales por grupo. La Fig. 13 muestra que la vacunación con p62 redujo el número de metástasis en los pulmones en un 50% en comparación con el control.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente cualquier experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Las realizaciones descritas ilustrativamente en el presente documento pueden ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos específicamente en el presente documento. Así, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. se leerán de forma extensa y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en el presente documento se han utilizado como términos de descripción y no de limitación, y no existe ninguna intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o sus partes, aunque se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

Por lo tanto, debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, la modificación, la mejora y la variación de las invenciones realizadas en el presente documento descritas en este documento pueden ser utilizadas por los expertos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos proporcionados en este documento son representativos de las realizaciones preferidas, son ejemplares y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la invención.

La invención se ha descrito amplia y genéricamente en este documento. Cada una de las partes más abreviadas y agrupaciones subgenéricas que formen parte de la descripción genérica también formarán parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que elimine cualquier tema del género, independientemente de si el material extirpado se menciona específicamente en el presente documento.

Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

La descripción anterior solo pretende transmitir una forma de entender la presente invención para los expertos en la materia, y no pretende ser limitante. Se apreciará que son posibles diversas modificaciones de las realizaciones descritas, sin apartarse del alcance de la invención. Por lo tanto, el alcance de la presente invención debe interpretarse únicamente mediante la referencia a las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> CURELAB ONCOLOGY, INC.
 SHNEIDER, Alexander
 SHERMAN, Michael
 SHIFRIN, Victor
 VENANZI, Franco

<120> Métodos y composiciones relacionadas con p62 para el tratamiento y la profilaxis del cáncer

<130> 151-00100.WO

<150> US 61/521,280

<151> 2011-08-08

<150> RU 2012108927

<151> 2012-03-11

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2923

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cctctcgagg	cggggcgggg	cctccgcggt	cgctacaaaa	gccgcgcggc	ggctgcgacc	60
gggacggccc	gttttcgcc	agctcgccgc	tcgctatggc	gtcgctcacc	gtgaaggcct	120
accttctggg	caaggaggac	gcggcgccgc	agattcgccg	cttcagcttc	tgctgcagcc	180
ccgagcctga	ggcgggaagc	gaggctgcgg	cggtccggg	accctgcgag	cggctgctga	240
gccgggtggc	cgccctgttc	cccgcgctgc	ggctggcgg	cttcaggcgc	cactaccgcg	300
atgaggacgg	ggacttggtt	gccttttcca	gtgacgagga	attgacaatg	gccatgtcct	360
acgtgaagga	tgacatcttc	cgaatctaca	ttaaagagaa	aaaagagtgc	cggcgggacc	420
accgcccacc	gtgtgctcag	gaggcgcccc	gcaacatggt	gcaccccaat	gtgatctgcg	480
atggctgcaa	tggcctgtg	gtaggaacct	gctacaagtg	cagcgtctgc	ccagactacg	540
acttgtgtag	cgtctgcgag	ggaaagggct	tgcaccgggg	gcacaccaag	ctcgattcc	600
ccagcccctt	cgggcacctg	tctgagggct	tctcgcacag	ccgctggctc	cgggaaggta	660
aacacggaca	cttcgggttg	ccaggatggg	aatgggtcc	accaggaaac	tggagcccac	720
gtcctcctcg	tgacggggag	gcccgcctcg	gccccacggc	agaatcagct	tctggtccat	780
cggaggatcc	gagtgtgaat	ttcctgaaga	acgttgggga	gagtgtggca	gctgccctta	840
gccctctggg	cattgaagtt	gatatcgatg	tggagcacgg	agggaaaaga	agccgcctga	900
ccccgtctc	tccagagagt	tccagcacag	aggagaagag	cagctcacag	ccaagcagct	960
gctgctctga	ccccagcaag	ccgggtggga	atgttgaggg	cgccacgcag	tctctggcgg	1020
agcagatgag	gaagatcgcc	ttggagtccg	aggggcgccc	tgaggaacag	atggagtccg	1080

ES 2 698 570 T3

ataactgttc aggaggagat gatgactgga cccatctgtc ttcaaaagaa gtggaccctg 1140
 ctacaggatga actccagtcc ctacagatgc cagaatccga agggccaagc tctctggacc 1200
 cctcccagga gggaccaca gggctgaagg aagctgcctt gtaccacat ctcccgccag 1260
 aggctgacct gcggctgatt gaggccctct cccagatgct gtccatgggc ttctctgatg 1320
 aaggcggctg gctcaccagg ctctgcaga ccaagaacta tgacatcgga gcggctctgg 1380
 acaccatcca gtattcaaag catccccgc cgttgtgacc acttttgccc acctctctg 1440
 cgtgcccctc ttctgtctca tagttgtggt aagcttgcgt agaattgcag gtctctgtac 1500
 gggccagttt ctctgccttc ttccaggatc aggggttagg gtgcaagaag ccatttaggg 1560
 cagcaaaaca agtgacatga agggagggc cctgtgtgtg tgtgtgctga tgtttcctgg 1620
 gtgccctggc tccttgacgc agggctgggc ctgcgagacc caaggctcac tgcagcggc 1680
 tcctgacccc tcctgcagg ggctacgtta gcagcccagc acatagcttg cctaattggct 1740
 ttcactttct cttttgtttt aatgactca taggtccctg acatttagtt gattattttc 1800
 tgctacagac ctggtacact ctgattttag ataaagtaag cctaggtggt gtcagcaggc 1860
 aggctgggga ggcagtggt gtggccttc tgctgggact gagaaggctc acgaagggca 1920
 tccgcaatgt tggtttact gagagctgcc tcctggtctc ttcaccactg tagttctctc 1980
 atttccaaac catcagctgc ttttaaaata agatctcttt gtagccatcc tgttaaattt 2040
 gtaaacaatc taattaaatg gcatcagcac ttaaccaat gacgtttgca tagagagaaa 2100
 tgattgacag taagtttatt gttaatgggt cttacagagt atctttaaaa gtgccttagg 2160
 ggaacctgt cctcctaac aagtgtatct cgattaataa cctgccagtc ccagatcaca 2220
 catcatcatc gaagtcttc ccagttataa agaggtcaca tagtcgtgtg ggtcgaggat 2280
 tctgtgctc caggaccagg gcccaccct ctgccaggg agtccttgcg tcccatgagg 2340
 tcttcccgca aggcctctca gaccagatg tgacggggtg tgtggcccga ggaagctgga 2400
 cagcggcagt gggcctgctg aggccttctc ttgaggcctg tgcctgggg gtccctgct 2460
 tagcctgtgc tggaccagct ggcctggggt ccctctgaag agacctggc tgctcactgt 2520
 ccacatgtga actttttcta ggtggcagga caaattgcgc ccatttagag gatgtggctg 2580
 taacctgctg gatgggactc catagctcct tcccaggacc cctcagctcc ccggcactgc 2640
 agtctgcaga gttctcctgg aggcagggc tgctgccttg tttcaccttc catgtcaggc 2700
 cagcctgtcc ctgaaagaga agatggccat gccctccatg tgtaagaaca atgccagggc 2760
 ccaggaggac cgctgcct gcctgggctc tggctgggccc tctggttctg acactttctg 2820
 ctggaagctg tcaggctggg acaggctttg attttgaggg ttagcaagac aaagcaata 2880
 aatgccttcc acctcaccgc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2923

<210> 2
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

ES 2 698 570 T3

<400> 2

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

Ala Arg Glu Ile Arg Arg Phe Ser Phe Cys Cys Ser Pro Glu Pro Glu
 20 25 30

Ala Glu Ala Glu Ala Ala Ala Gly Pro Gly Pro Cys Glu Arg Leu Leu
 35 40 45

Ser Arg Val Ala Ala Leu Phe Pro Ala Leu Arg Pro Gly Gly Phe Gln
 50 55 60

Ala His Tyr Arg Asp Glu Asp Gly Asp Leu Val Ala Phe Ser Ser Asp
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Thr Met Ala Met Ser Tyr Val Lys Asp Asp Ile Phe Arg
 85 90 95

Ile Tyr Ile Lys Glu Lys Lys Glu Cys Arg Arg Asp His Arg Pro Pro
 100 105 110

Cys Ala Gln Glu Ala Pro Arg Asn Met Val His Pro Asn Val Ile Cys
 115 120 125

Asp Gly Cys Asn Gly Pro Val Val Gly Thr Arg Tyr Lys Cys Ser Val
 130 135 140

Cys Pro Asp Tyr Asp Leu Cys Ser Val Cys Glu Gly Lys Gly Leu His
 145 150 155 160

Arg Gly His Thr Lys Leu Ala Phe Pro Ser Pro Phe Gly His Leu Ser
 165 170 175

Glu Gly Phe Ser His Ser Arg Trp Leu Arg Lys Val Lys His Gly His
 180 185 190

Phe Gly Trp Pro Gly Trp Glu Met Gly Pro Pro Gly Asn Trp Ser Pro
 195 200 205

Arg Pro Pro Arg Ala Gly Glu Ala Arg Pro Gly Pro Thr Ala Glu Ser
 210 215 220

Ala Ser Gly Pro Ser Glu Asp Pro Ser Val Asn Phe Leu Lys Asn Val
 225 230 235 240

ES 2 698 570 T3

Gly Glu Ser Val Ala Ala Ala Leu Ser Pro Leu Gly Ile Glu Val Asp
 245 250 255

Ile Asp Val Glu His Gly Gly Lys Arg Ser Arg Leu Thr Pro Val Ser
 260 265 270

Pro Glu Ser Ser Ser Thr Glu Glu Lys Ser Ser Ser Gln Pro Ser Ser
 275 280 285

Cys Cys Ser Asp Pro Ser Lys Pro Gly Gly Asn Val Glu Gly Ala Thr
 290 295 300

Gln Ser Leu Ala Glu Gln Met Arg Lys Ile Ala Leu Glu Ser Glu Gly
 305 310 315 320

Arg Pro Glu Glu Gln Met Glu Ser Asp Asn Cys Ser Gly Gly Asp Asp
 325 330 335

Asp Trp Thr His Leu Ser Ser Lys Glu Val Asp Pro Ser Thr Gly Glu
 340 345 350

Leu Gln Ser Leu Gln Met Pro Glu Ser Glu Gly Pro Ser Ser Leu Asp
 355 360 365

Pro Ser Gln Glu Gly Pro Thr Gly Leu Lys Glu Ala Ala Leu Tyr Pro
 370 375 380

His Leu Pro Pro Glu Ala Asp Pro Arg Leu Ile Glu Ser Leu Ser Gln
 385 390 395 400

Met Leu Ser Met Gly Phe Ser Asp Glu Gly Gly Trp Leu Thr Arg Leu
 405 410 415

Leu Gln Thr Lys Asn Tyr Asp Ile Gly Ala Ala Leu Asp Thr Ile Gln
 420 425 430

Tyr Ser Lys His Pro Pro Pro Leu
 435 440

REIVINDICACIONES

1. Un agente que comprende:
 - a. al menos 30 aminoácidos consecutivos de un polipéptido p62/SQSTM1;
 - 5 b. un ácido nucleico que codifica p62/SQSTM1, en el que dicho ácido nucleico que codifica p62/SQSTM1 codifica al menos 30 aminoácidos consecutivos de un polipéptido p62/SQSTM1;
 - c. un polipéptido p62/SQSTM1 al menos el 90% idéntico a la SEQ ID NO. 2;
 - d. un polipéptido p62/SQSTM1 con al menos una o más deleciones de dominio;
 - e. un ácido nucleico p62/SQSTM1 que codifica un polipéptido al menos 90% idéntico a la SEQ ID NO: 2; o
 - f. un ácido nucleico p62/SQSTM1 que codifica un polipéptido con al menos una o más deleciones de dominio;
- 10 para su uso en el tratamiento, alivio, mejora, paliación, retraso en el inicio, inhibición de la progresión, reducción de la gravedad y/o reducción de la incidencia de uno o más síntomas de un cáncer en un sujeto.
2. El agente para el uso de la reivindicación 1(d) o 1(f) en el que dicha una o más deleciones de dominio se seleccionan del grupo que consiste en PB1, ZZ, NLS2, TB, NLS1, NES, LIR, KIR y UBA.
- 15 3. El agente para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido p62/SQSTM1 o ácido nucleico que codifica p62 está comprendido en un polipéptido de fusión o ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión.
- 20 4. El agente para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho agente es para la administración con un adyuvante y/o uno o más componentes coestimulantes y/o una o más moléculas que bloqueen los mecanismos inmunitarios supresores o reguladores negativos; en el que dicho uno o más componentes coestimulantes se seleccionan del grupo que consiste en proteínas de la superficie celular, citoquinas, quimiocinas y moléculas de señalización; y en donde dicha una o más moléculas que bloquean mecanismos inmunitarios supresores o reguladores negativos se seleccionan del grupo que consiste en: anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-CD25, anticuerpo anti-CD4 y la proteína de fusión IL13Ra2-Fc.
- 25 5. El agente para el uso de la reivindicación 4, en el que dicho adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: adyuvantes de tipo gel, microbianos, particulados, emulsión de aceite, basados en tensioactivo y sintéticos.
6. El agente para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho agente es para la administración con una o más terapias contra el cáncer.
7. El agente para el uso de la reivindicación 6, en el que dicha una o más terapias contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: una molécula quimioterapéutica, radiación y una molécula antiangiogénica.
- 30 8. El agente para el uso de la reivindicación 7, en el que dicha molécula quimioterapéutica se selecciona del grupo que consiste en: ciclofosfamida, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, metotrexato, navelbina, capecitabina, mitomicina C y 5-fluorouracilo.
- 35 9. El agente para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho cáncer es un cáncer de tumor sólido, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de bronquios, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de cerebro, cáncer de sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de testículo, cáncer del tracto biliar, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de glándula salival, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma y sarcoma, o cáncer de tejidos hematológicos.
- 40 10. El agente para el uso de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho sujeto se selecciona del grupo que consiste en: un sujeto diagnosticado con cáncer, un sujeto tratado previamente para el cáncer, un sujeto con antecedentes familiares de cáncer y un sujeto predisuesto al cáncer.
- 45 11. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicho agente comprende un ácido nucleico que codifica p62/SQSTM1, en el que dicha proteína p62 codificada es al menos un 90% idéntica a la SEQ ID NO. 2, y en la que dicho ácido nucleico que codifica p62 comprende además un plásmido o un vector viral.
- 50 12. El agente para el uso de la reivindicación 11, que además comprende: uno o más replicones virales autorreplicantes, uno o más codones optimizados, uno o más motivos estimuladores de CpG, una o más secuencias VP22 del virus de la enfermedad de Marek tipo 1, uno o más vectores de administración de la mucosa, o en donde dicho agente es para su uso en electroporación in vivo o un régimen de estimulación de cebado.

13. Una vacuna de ácido nucleico o polipéptido p62 que comprende un polipéptido p62/SQSTM1 o ácido nucleico que codifica p62/SQSTM1 o su fragmento, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 (a) - (f), 2 ó 3.

5 14. Una vacuna de ácido nucleico o polipéptido p62 según la reivindicación 13, que comprende además un adyuvante y/o uno o más componentes coestimulantes y/o una o más moléculas que bloquean los mecanismos inmunitarios reguladores negativos o supresores como se define en la reivindicación 4 o la reivindicación 5.

10 15. Una vacuna de ácido nucleico o polipéptido p62 según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que comprende un ácido nucleico que codifica p62/SQSTM1, en el que dicha proteína p62 codificada es al menos un 90% idéntica a la SEQ ID N°. 2, y en el que dicho ácido nucleico que codifica p62 comprende además un plásmido o un vector viral; y/o que comprende además uno o más replicones virales autorreplicantes, uno o más codones optimizados, uno o más motivos estimulantes de CpG, una o más secuencias VP22 del virus de la enfermedad de Marek tipo 1, uno o más vectores de administración de la mucosa, o en donde dicho agente es para su uso en electroporación in vivo o un régimen de estimulación de cebado.

```

1 cctctcgagg cggggcgggg cctccgcggt cgtacaaaa gccgcggcgc ggctgcgacc
61 gggacggccc gttttccgcc agctcgcggc togetatggc gtogotcacc gtgaaggcct
121 accttctggg caaggaggac ggggcgcggc agattcgcgc cttcagcttc tgcitgoagcc
181 ccgagcctga gggcgaagcc gaggcctggg cgggtccggg accctgcgag cggctgctga
241 gccgggtggc cgcctgttcc ccgcgcctgc ggctggcggc cttccaggcg cactacggcg
301 atgaggaggg ggacttggtt gcottttcca gtgacgagga attgacaatg gccatgtcct
361 acgtgaagga tgacatcttc cgaatctaca ttaaagagaa aaaagagtgc cggcgggacc
421 accgccacc gtgtgctcag gaggcgcgcc gcaacatggt gcccccacat gtgatctggc
481 atggctgcaa tgggctgtg gttaggaacc gctacaagtg cagcgtctgc ccagactacc
541 acttgtgtag cgtctgcgag gaaagggtc tgcaccgggg gcacaccaag ctcccatcc
601 ccagcccctt cgggcacctg tctgagggtc tctcgcacag ccgctggctc cgggaaggta
661 aacaccgaca ctccgggtgg ccaggatggg aatgggtcc accaggaac tggagcccac
721 gtctctctcg tgcaggggag gccgcctctg gccccacggc agaatcagct tctggctccat
781 cggaggatcc gagtgtgaat ttctgaaga acgttgggga gagtgtggca gctgccotta
841 gccctctggg cactgaagtt gatctgatg tggagcagc agggamaaga agccgcctga
901 cccccgtctc tccagagagt tccagcacag aggagaagag cagctcaccg ccaagcagct
961 gctgctctga cccagcaag ccgggtggga atgttgaggg cgcaccgcag tctctggcgg
1021 agcagatgag gaagatcgcc ttggagtccg aggggcgcc tgagyaacag atggagtccg
1081 ataactgttc aggaggagat gatgactgga ccatctgtc ttaaaaagaa gtggaaccgt
1141 ctacagggtg antccagtc ctacagatgc cagaatccga agggccaagc tctctggacc
1201 cctccagga gggacccaca gggtgaagg aagetgcctt gtaaccacat ctcccgccag
1261 ag tgacc gccgctgatt gactccctct ccagatgct gtcctatggc ttctctgatg
1321 aaggcggctg gctcaccagg ctctgcaga ccaagaaota tgacatcgga gggctctgg
1381 acaccatcca gtattcaaa cctccccgc cgttgtgacc acttttgcgc acctctctg
1441 cgtgcacctc tctcgtctca tagttgtgtt aagcttgcgt agaattgcag gctctgtac
1501 gggccagttt ctctgccttc ttccaggatc aggggttagg gtgcaagaag ccatttaggg
1561 cagcaaaaca agtgacatga agggagggtc cctgtgtgtg tgtgtgtga tgttctctg
1621 gtgcctctgg tctctgcagc agggctgggc ctgcgagacc caaggctcac tgcagcgcc
1681 tctgacccc tccctgcagg gctacgta gcagcccagc acatagcttg cctaatggct
1741 ttaactttct cttttgtttt aatgactca taggtccctg acatttagtt gattattttc
1801 tgctacagac ctggtacaat ctgattttag ataaagtaag cctaggtgtt gtcagcagcc
1861 aggtcgggga ggcagtggt gtgggcttcc tgotgggact gagaaggctc accaagggca
1921 tccgcaatgt tggtttca ct gagagctgcc tctgtgtctc ttcaccactg tagttctctc
1981 atttccaaac cctcagctgc ttttaaaata agatctcttt gtagccatcc tgttaatttt
2041 gtaaacaaat taattaaatg gactcagcac ttaaacaaat gaogtttgca tagagagmaa
2101 tgattgacag taagtttatt gttaatggtt ctacagagt atctttaa aa gtgccttagg
2161 ggaacctgt cctctctaac aagtgtatct cgttaataaa cctgccagtc ccagatcaca
2221 catcatcatc gaagtcttcc ccagttataa agaggtcaca tagtctgtg ggtcagggat
2281 tetgtgcctc caggaccagg gcccccacct ctgcaccagg agtctctggc tcccatgagg
2341 tcttcccgca aggcctctca gaccagatg tgacggggtg tgtggcccga ggaagctgga
2401 cagcggcagt gggcctgtg aggcctctc ttgaggctg tctctggggg gtccttggct
2461 tagcctgtgc tggaccagct ggcctggggt cctctgaag agacctggc tgetcactgt
2521 ccacatgtga actttttota ggtggcagga caaattgcgc ccatttagag gatgtggctg
2581 taacotgctg gatgggaoto catagctct tcccaggacc cctcagctcc ccggcactgc
2641 agtctgcaga gttctctctg aggcagggcc tgcctcctt tttcaccttc catgtcagcc
2701 cagcctgtcc ctgaaagaga agatggccat gccctccatg tgaagaaca atgccagggc
2761 ccaggaggac cgcctgcct gctgggctc tggctgggcc tetggtctg acactttctg
2821 ctggaagctg tccagctggg acagctttg atttgagggt ttacaaagac aaagcaata
2881 aatgccttcc acctcaccgc aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa (SEQ ID NO: 1)

```

FIG. 1

```
1 masltvkayl lqkedaarei rrfsfccspe peaeaeaaag pgpcerilsr vaalfpalrp
61 ggfqahyrde dqdlvafssd eeltmamsyv kddifriyik ekkeccrrdhr ppcageaprn
121 mvhpnvicdg cngpvvgtry kcsvcvdydl cvcvegkgh rghtklafps pfghisegfs
181 harwlrvkvh ghfgwpgwem gppgawsprp pragearpgp taesasgpse dpsvnlknv
241 gesvaaalsp lgievdiva hggkrsltp vspessstee ksssqpscc sdpskpggv
301 egatqslaeg mrkialeseg rpeeqmesdn caggdddwth lsskevdpst gelqslqmpc
361 segpseldps qegptqlkea alyphippea dpriieslsq mlsmgfsdeg gwltrllqtk
421 nydigaaldt iqyskhpppl (SEQ ID NO: 2)
```

FIG. 2

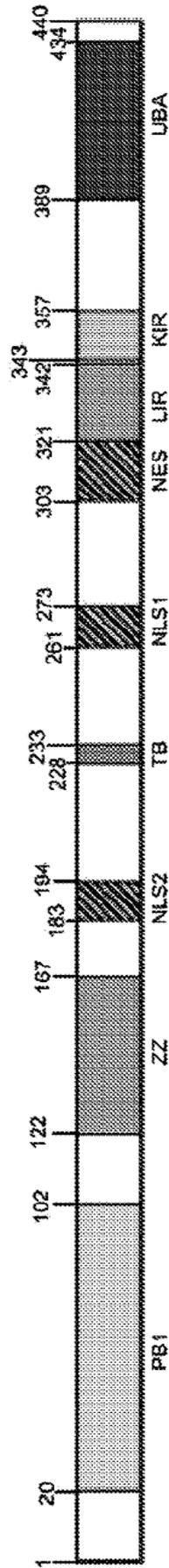


FIG. 3

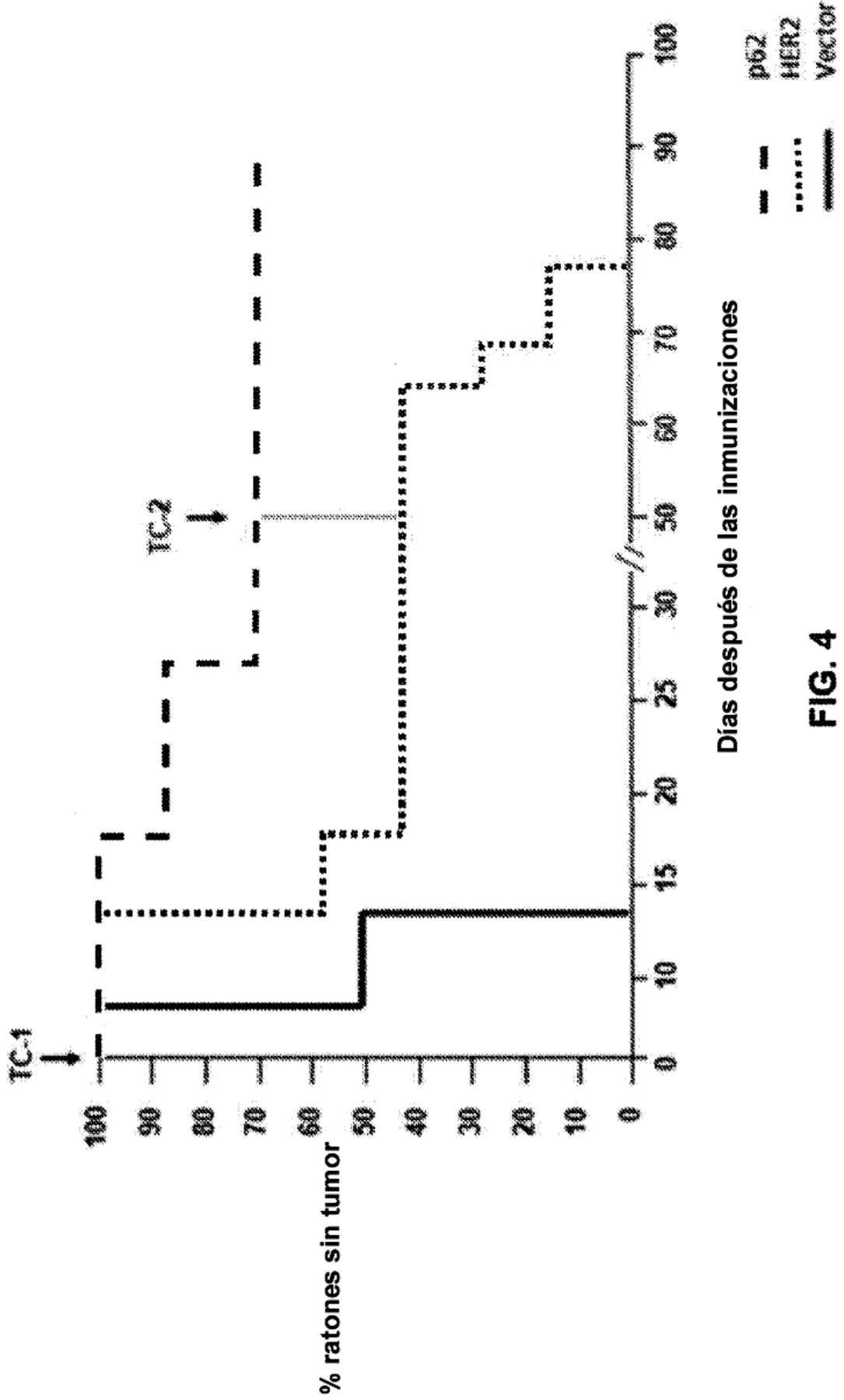


FIG. 4

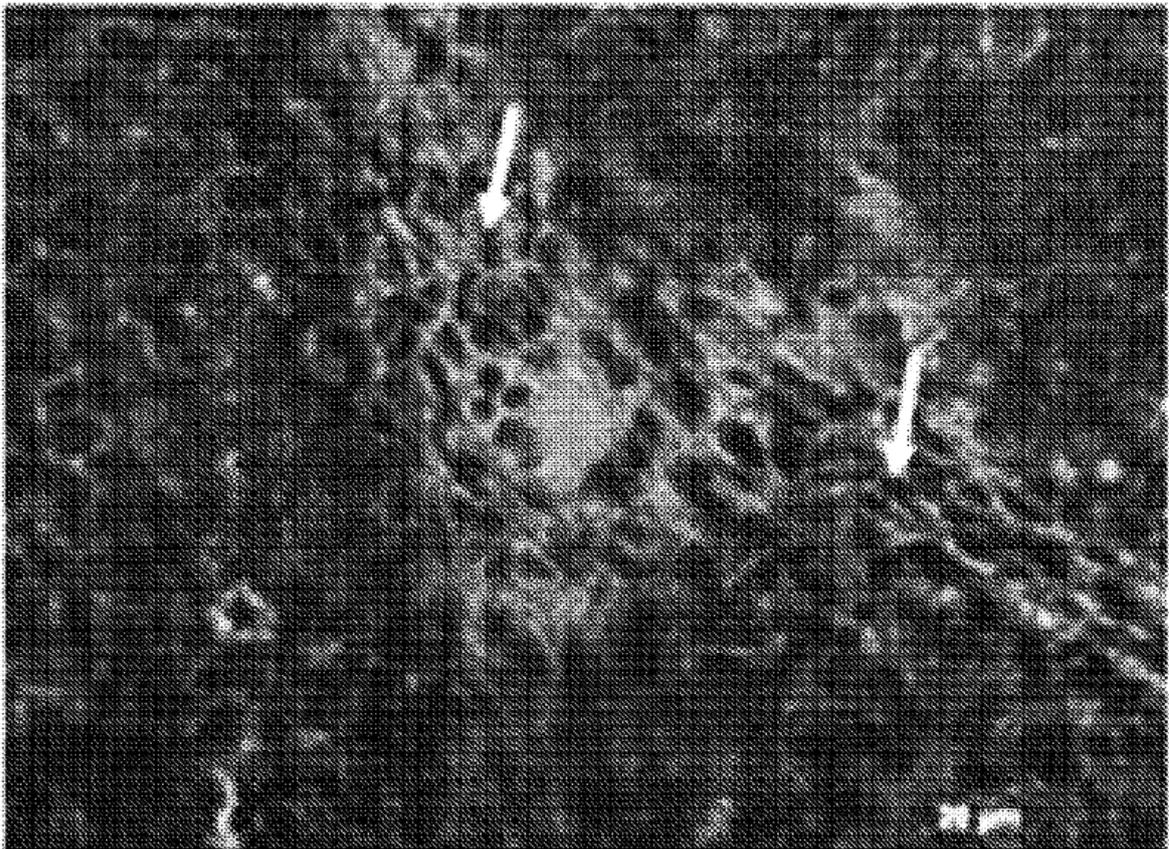
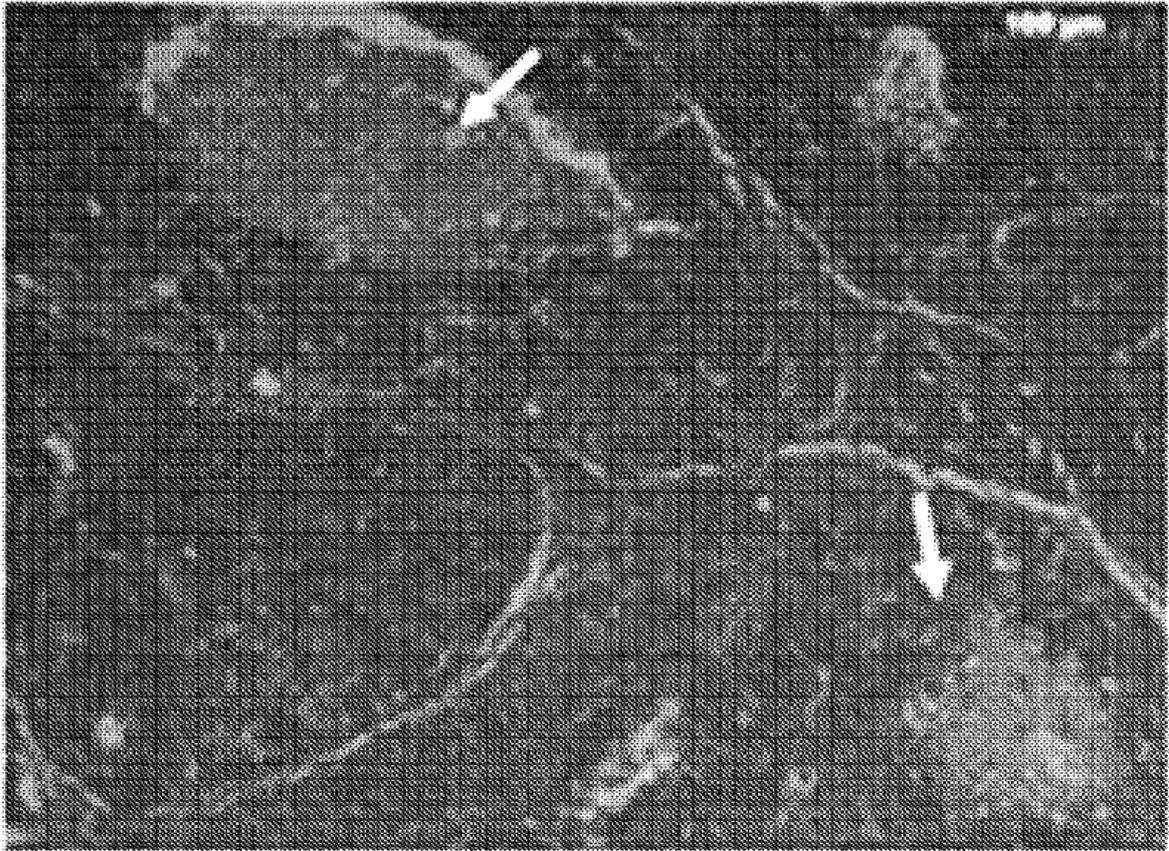


FIG. 5

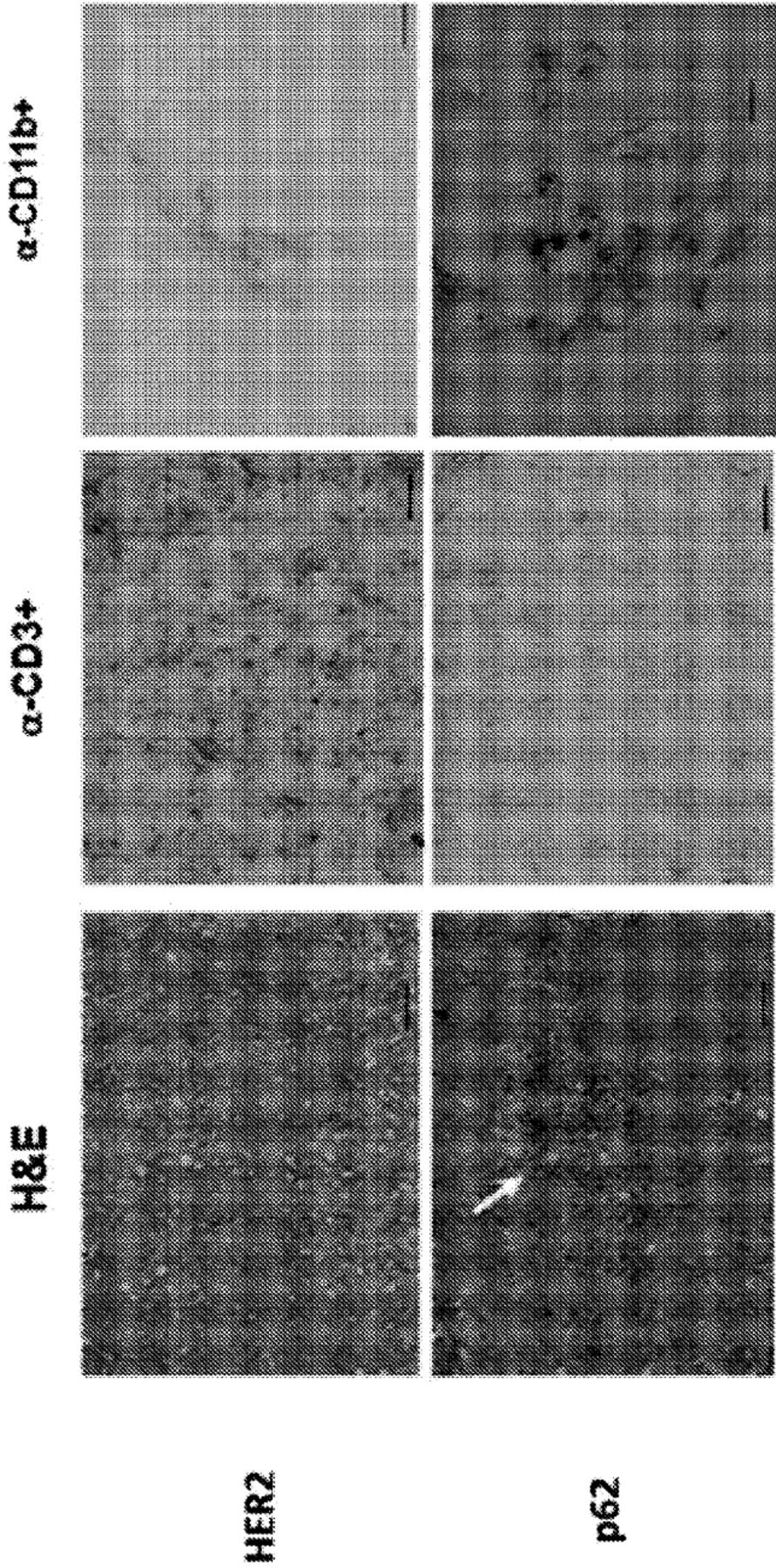


FIG. 6

Inyecciones i.m. semanales de plásmidos (70 µg/rata)

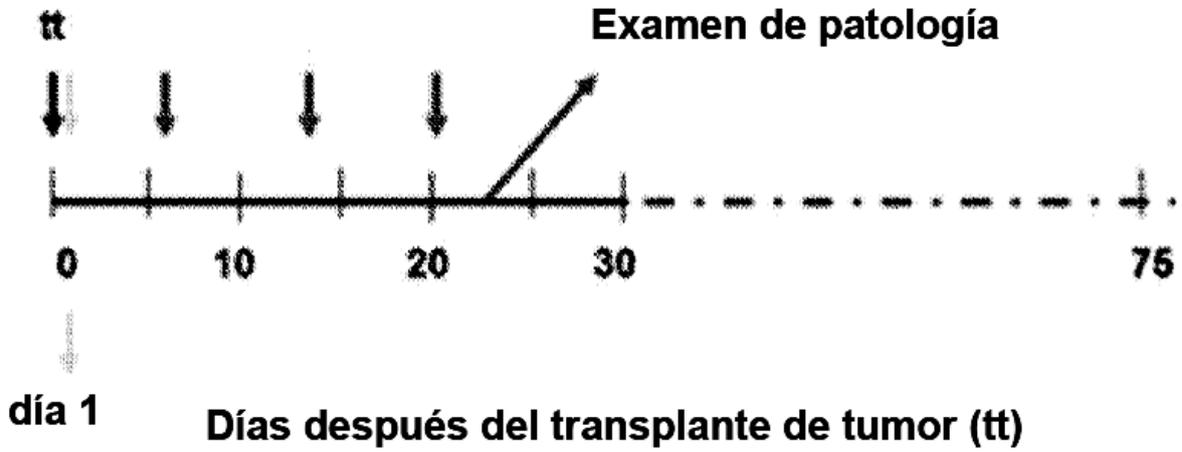


FIG. 7

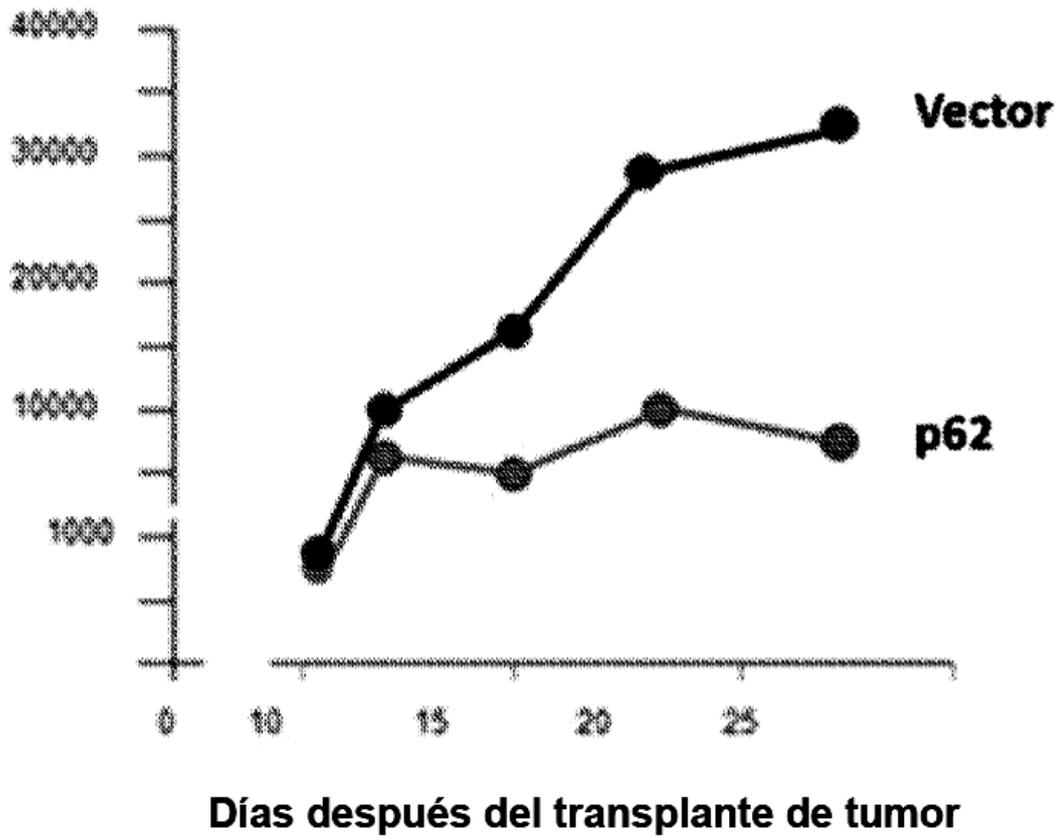
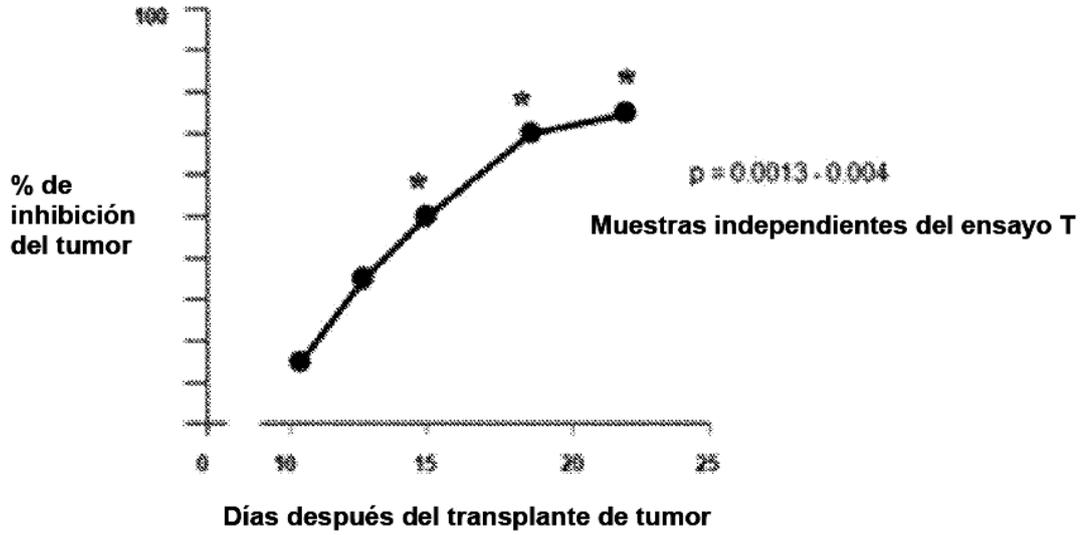


FIG. 8



% de inhibición del tumor = (grupos de control de volumen de tumor - p62 de volumen de tumor) / control de volumen de tumor x 100

FIG. 9

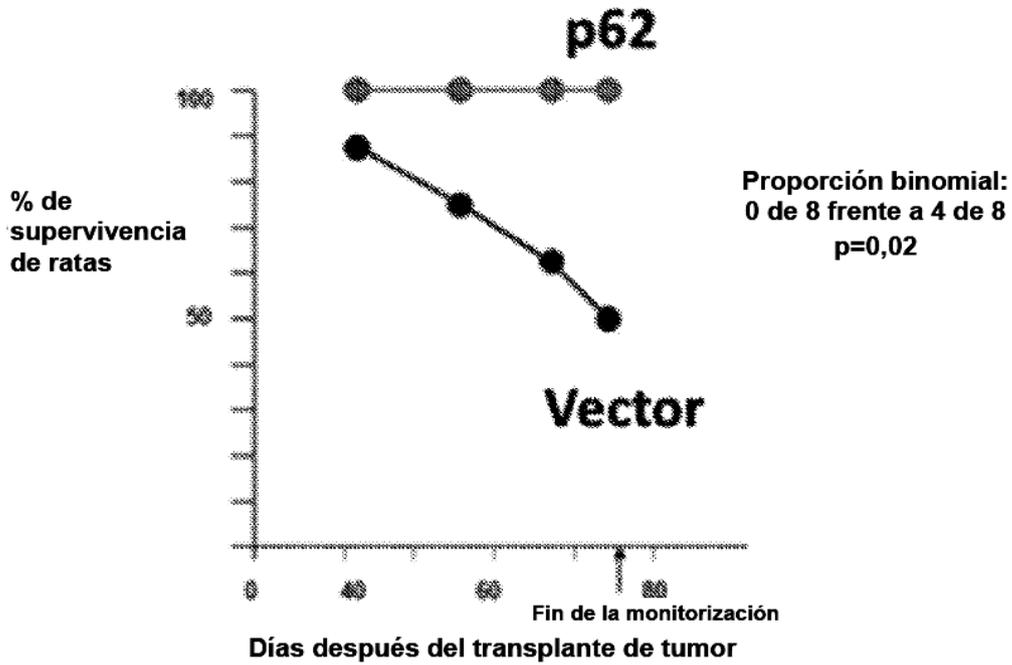
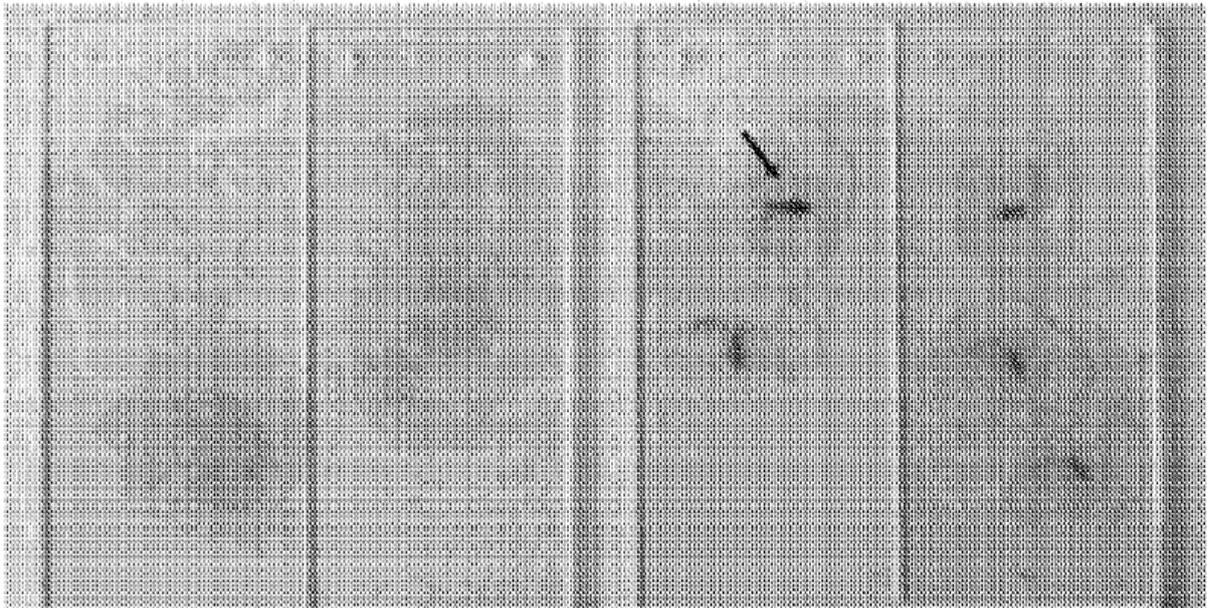


FIG. 10

Vector

p62



→ Puntos de sangre

FIG. 11

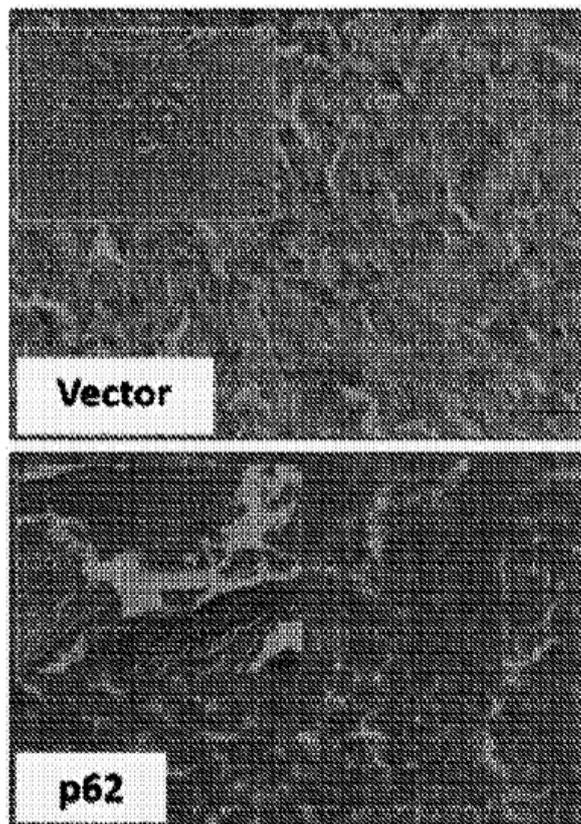


FIG. 12

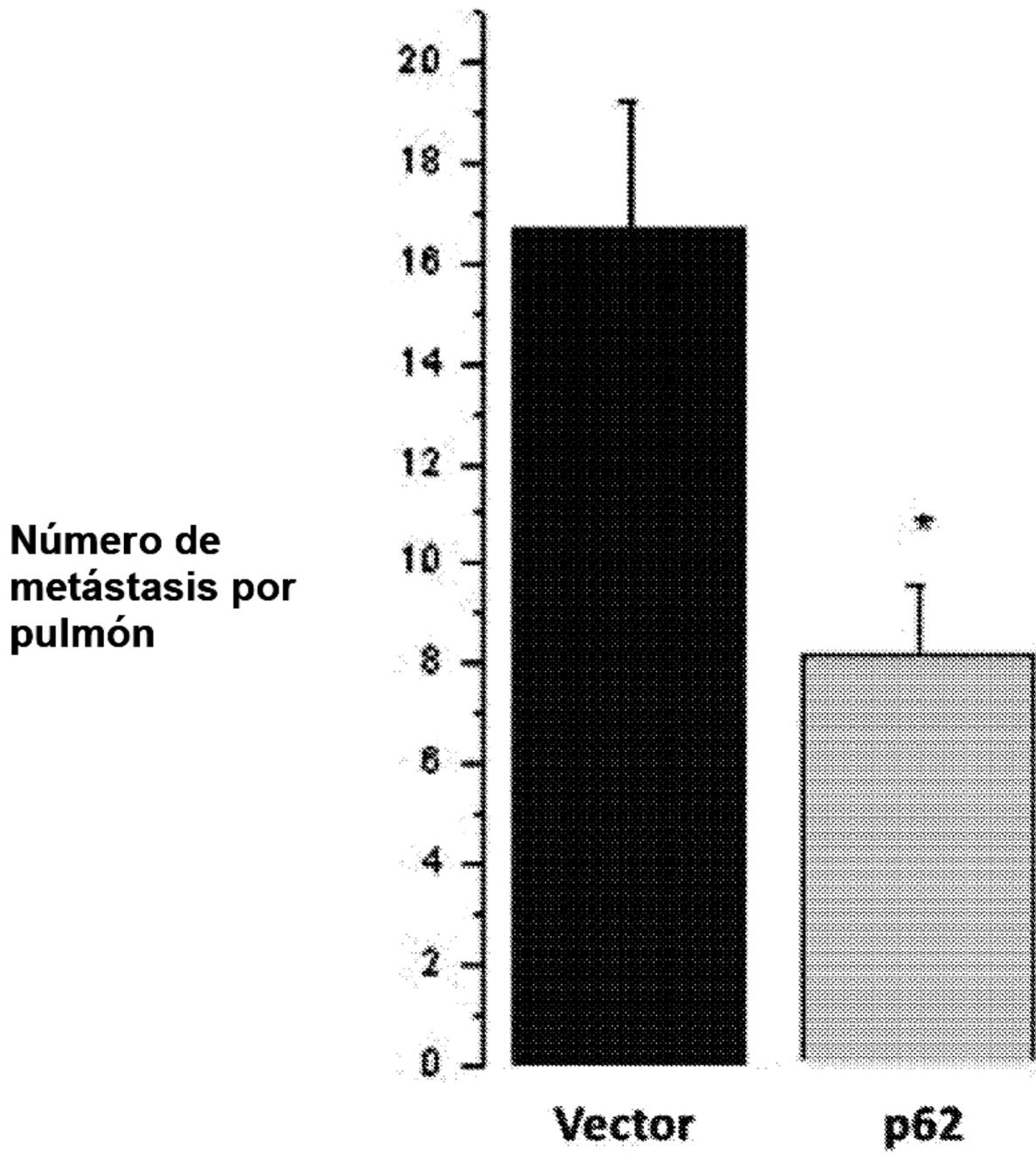


FIG. 13