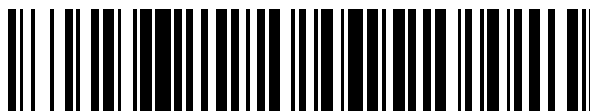


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 190**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/82 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2013** **PCT/US2013/059737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** **WO14043518**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013** **E 13773456 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 2895191**

54 Título: **Proteína Brachyury, vectores adenovirales que codifican proteína Brachyury y su uso**

30 Prioridad:

14.09.2012 US 201261701525 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHLOM, JEFFREY y
PALENA, CLAUDIA M.**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 752 190 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

Proteína Brachyury, vectores adenovirales que codifican proteína Brachyury y su uso

5 **Referencia a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/701.525, presentada el 14 de septiembre de 2012.

10 **Listado de secuencias**

El listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos presentado originalmente con la solicitud de patente forma parte de la presente divulgación.

15 Las secuencias de aminoácidos y nucleicos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran utilizando abreviaturas de letras mayúsculas para bases de nucleótidos, y un código de tres letras para aminoácidos, tal como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácidos nucleicos, pero la cadena complementaria se entiende como incluida en cualquier referencia a la cadena desplegada. En el listado de secuencias adjunto:

20 La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos de una proteína Brachyury humana.

La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury humana.

25 La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de aminoácidos de una proteína Brachyury murina.

La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína Brachyury murina.

30 La SEQ ID NO: 5 es un epítipo de Brachyury clase IIA.

La SEQ ID NO: 6 es un epítipo de Brachyury clase IIB.

Campo

35 La presente solicitud se refiere al campo de la terapéutica del cáncer, específicamente al uso de una proteína Brachyury y vectores no de levadura no de poxvirus que codifican una proteína Brachyury para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

40 El gen *Brachyury* clonado inicialmente a partir de mutantes del desarrollo del ratón, caracterizado por una detención en la formación del mesodermo (Hermann et al, *Nature* 1990; 343: 617-22) se ha reconocido como un gen que es importante en el desarrollo del mesodermo durante la gastrulación. Brachyury es miembro de una familia de factores de transcripción, designados factores de transcripción de T-box; estos factores se caracterizan por un dominio de unión al ADN conservado (Papaioannou et al, *Bioessays* 1998; 20: 9-19). Estos factores de transcripción desempeñan un papel esencial en la formación y organización del mesodermo en vertebrados (véase, por ejemplo, Edwards et al., *Genome Res* 1996; 6: 226-33). Además del importante papel de las proteínas T-box en el control de procesos de desarrollo, varios miembros de esta familia están desregulados en el cáncer. Por ejemplo, se ha notificado que el gen *Thx2* humano se ha amplificado en líneas celulares de cáncer de páncreas (Mahlamaki et al. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 353-8) y está sobreexpresado en tumores de mama BRCA-1- y BRCA-2- mutados (Sinclair et al., *Cancer Res* 2002; 62: 3587-91). Además, se ha demostrado que la expresión de *Tbx3* aumenta en ciertas líneas celulares de cáncer de mama humano (Fan et al., *Cancer Res* 2004; 64: 5132-9). La expresión de Brachyury también se ha documentado en líneas de teratocarcinoma humano: un subconjunto de tumores de células germinales, los teratocarcinomas son células de carcinoma embrionario con competencia para la diferenciación del mesodermo (Gokhale et al., *Cell Growth Differ* 2000; 11: 157-62) y en cordomas (véase, por ejemplo, Vojovic et al, *J Pathol* 2006; 209: 157-65).

60 Las intervenciones inmunoterapéuticas contra el cáncer dependen de la identificación de antígenos tumorales capaces de provocar una respuesta inmune del hospedador contra células de tumor. Las moléculas son buenas dianas que se expresan selectivamente por células malignas y que también son esenciales para la transformación maligna y/o la progresión tumoral. La transición epitelial-mesénquimal (EMT) se ha reconocido como una etapa clave durante la progresión de tumores primarios en metástasis (Thiery et al, *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 442-54). Se han identificado varias moléculas que desempeñan un papel clave en la EMT durante la progresión tumoral (Huber et al, *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 548-58), entre ellas los factores de transcripción Twist, Snail y Slug (Yang et al., *Cell* 2004; 117: 927-39; Cano et al., *Nat Cell Biol* 2000; 2: 76-83). Las moléculas que desencadenan EMT podrían funcionar para prevenir la invasión tumoral y la metástasis. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de reactivos

que induzcan una respuesta inmune eficaz al cáncer, incluyendo una respuesta de linfocitos TCD4 y CD8. El documento WO 2010/121180 A1 se refiere a composiciones inmunoterapéuticas contra el cáncer y describe vehículos a base de levadura que comprenden antígenos de tumor que incluyen Brachyury. El documento WO 2008/106551 A1 se refiere a polipéptidos de Brachyury y métodos para su uso y describe la inducción de una respuesta inmune a Brachyury y/o la utilización de una molécula inhibidora para disminuir la expresión de Brachyury para tratar un tumor.

Resumen

La presente invención proporciona las realizaciones definidas según los artículos 1-11:

1. Una cantidad eficaz de un vector adenoviral que codifica (a) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 que se une específicamente a la molécula de histocompatibilidad mayor Clase II (MHC); o (b) un polipéptido que comprende al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 que se une específicamente a la molécula de histocompatibilidad mayor Clase II (MHC); para su uso en un método para inducir una respuesta inmune para Brachyury, donde la respuesta inmune comprende una respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury, preferentemente, comprende además una respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de Brachyury, y donde el sujeto es preferentemente un ser humano.

2. La cantidad eficaz del vector adenoviral del artículo 1 para su uso de acuerdo con el artículo 12, que comprende además la medición de la respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury.

3. La cantidad eficaz del vector adenoviral del artículo 1 o 2 para su uso de acuerdo con el artículo 1 o 2, donde el sujeto tiene cáncer y donde el cáncer es preferentemente un cáncer resistente a quimioterapia o un cáncer resistente a radiación.

4. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-3 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-3, donde el polipéptido comprende (a) de 15 a 435 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; o (b) al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1.

5. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-4 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-4, donde el vector adenoviral comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula inmunoestimuladora, donde la molécula inmunoestimuladora se selecciona del grupo que consiste en IL-2, ICAM-1, LFA-3, CD72, GM-CSF, TNF- α , TNF- γ , IL-12 y IL-6.

6. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-5 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-5, que comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un adyuvante, donde el adyuvante es preferentemente quitosano.

7. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-6 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-6, que comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, donde el segundo agente es un agente quimioterapéutico, radiación o una molécula pequeña terapéutica dirigida o anticuerpos monoclonales, preferentemente, el segundo agente es un inhibidor de receptor de factor de crecimiento epitelial, un inhibidor de factor de crecimiento de transformación- β (TGB)- β o un inhibidor de tirosina quinasa.

8. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-6 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-6, donde el vector adenoviral codifica una molécula co-estimuladora, donde la molécula co-estimuladora es preferentemente uno o más entre B7-1, B72, LFA e ICAM-1.

9. La cantidad eficaz del vector adenoviral del artículo 3 para el uso de acuerdo con el artículo 3, donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata o leucemia linfocítica crónica (CLL).

10. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 4-7 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 4-7, donde el método es un método para prevenir cáncer en el sujeto, donde preferentemente, el sujeto está en riesgo de desarrollar cáncer.

11. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 4-7 y 10 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 4-7 y 10, donde el sujeto tiene una neoplasia intraepitelial prostática de grado alto, poliposis adenomatosa familiar o atipia del pecho.

Se divulga en el presente documento que la proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury se puede utilizar para inducir linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury *in vivo* y *ex vivo*. Se divulga asimismo que la proteína Brachyury y los polipéptidos Brachyury pueden utilizarse para estimular la producción de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury y linfocitos T CD8⁺ específicos de Brachyury. Brachyury se expresa en numerosos cánceres humanos, como el cáncer de intestino delgado, estómago, vejiga renal, útero, ovario, testículos, pulmón, colon, próstata, tubo bronquial, leucemia linfocítica crónica (CLL), otras neoplasias malignas basadas en linfocitos B y cáncer de mama, como los carcinomas ductales infiltrantes de la mama. Por lo tanto, la proteína Brachyury, polipéptidos Brachyury y los ácidos nucleicos que codifican la proteína y/o los polipéptidos Brachyury pueden utilizarse para producir linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury y linfocitos T CD8⁺, que pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención del cáncer.

En el presente documento se divulgan métodos para inducir linfocitos T específicos de Brachyury CD4+ y/o linfocitos T específicos de Brachyury CD8+. Los métodos incluyen el uso de una proteína Brachyury, un polipéptido Brachyury, ácidos nucleicos que codifican la proteína Brachyury y/o polipéptidos Brachyury, o células hospedadoras que expresan la proteína o polipéptido Brachyury, tales como las células hospedadoras *Salmonella* o *Listeria*. Estos agentes pueden administrarse solos o en combinación con otro agente, como una citocina y/u otra terapia contra el cáncer. En el presente documento se divulgan métodos para tratar a un sujeto con un cáncer, como un cáncer de mama, cáncer de intestino delgado, estómago, riñón, vejiga, útero, ovarios, testículos pulmón, colon o próstata, o un tumor de origen linfocitos B, o para prevenir estos cánceres en un sujeto. Los métodos incluyen la medición de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury. Los métodos inducen también linfocitos T específicos de Brachyury CD8+.

Se divulgan vectores no de levadura no de pox que codifican una proteína Brachyury que pueden utilizarse para inducir linfocitos T específicos de Brachyury CD4+ y/o linfocitos T específicos de Brachyury CD8+. En algunos ejemplos no exhaustivos, el vector es un alfavirus, un lentivirus, un adenovirus, un virus del sarampión o un vector de poliovirus. Asimismo, se divulga en el presente documento células hospedadoras transformadas con estos vectores, como células hospedadoras de *Salmonella* y *Listeria*.

Asimismo, se divulgan en el presente documento métodos para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa en un sujeto. Estos métodos incluyen poner en contacto una célula dendrítica con una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, un polipéptido que comprende al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 que se une específicamente a un complejo de histocompatibilidad mayor clase II (MHC clase II) o una célula hospedadora de *Listeria* o *Salmonella* que expresa la proteína o el polipéptido, preparando así una célula presentadora de antígeno específica. Estos métodos también incluyen administrar la célula presentadora de antígeno al sujeto, induciendo así una respuesta inmune e inhibiendo el crecimiento de la célula cancerosa.

Las características y características expuestas, así como otras, serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias realizaciones, que prosigue haciendo referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Los linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury pueden expandirse desde PBMC de donantes normales por cultivo en presencia de proteína Brachyury recombinante purificada. Se prepararon por cultivo células dendríticas (DC) de 2 donantes normales en presencia de GM-CSF e IL-4. El día 5, se añadió una proteína Brachyury recombinante purificada (10 µg/ml) durante 48 horas. Para el donante 2, se estableció un cultivo adicional utilizando proteína de control HSA (albúmina de suero humano) purificada (10 µg/ml). En el día 7, se recogieron DC pulsadas con proteína, se irradiaron (20 Gy) y se utilizaron como células presentadoras de antígeno (APC) para estimular PBMC autólogas (relación DC: PBMC igual a 1: 10). En los días 3 y 5, se añadió IL-2 (20 U/ml) a los cultivos. Se recogieron los linfocitos T el día 7 y se aislaron los linfocitos T CD4+ por selección negativa con perlas magnéticas. Se estimularon de manera similar los linfocitos T CD4+ durante un ciclo adicional de 7 días. En el día 7, se volvieron a aislar los linfocitos T CD4+ usando perlas magnéticas y se evaluó la producción de IFN-gamma en respuesta a PBMC irradiadas, autólogas (relación PBMC: linfocitos T igual a 3: 1) solas o pulsadas con proteína HSA de control frente a proteína Brachyury (10 µg/ml). Se recogieron los sobrenadantes del cultivo a las 96 horas y se evaluaron en cuanto a IFN-gamma por ELISA.

FIG. 2. Una línea de linfocitos T CD4 específicos de Brachyury libera citocinas y quimiocinas cuando se estimula con un péptido Brachyury de unión de clase II DRB1 * 0401. Epítipo Brachyury clase IIA (SEQ ID NO: 5) y Epítipo Brachyury clase IIB (SEQ ID NO: 6).

FIG. 3A-3E. Brachyury induce una transición epitelial a mesenquimal (EMT) en células de carcinoma de mama. (A) transfectantes estables MCF7-pcDNA y MCF7-phBrachyury cultivados en una superficie de plástico para imágenes de campo brillante (paneles superiores) y análisis de inmunofluorescencia de la expresión de E-cadherina (señal verde); la señal azul representa núcleos teñidos con DAPI (paneles inferiores). (B) Imágenes de membrana de la migración celular *in vitro* (paneles superiores) y ensayos de invasión de ECM (paneles inferiores) para células MCF7-pcDNA y MCF7-pBrachyury. Los resultados son representativos de tres experimentos. (C, D) Se realizó la PCR en tiempo real en los pares de células indicados para Brachyury, *Fibronectina* y *Vimentina*. Los valores (media ± SEM) se expresan como una relación con el control endógeno *GAPDH*. (E) Análisis inmunofluorescente de la expresión de fibronectina en MDA-MB-436-con.ARNhc y MDA-MB-436-Br. Transfectantes estables de ARNhc (aumento original 20X). La señal verde representa tinción para Fibronectina; la señal azul representa los núcleos teñidos con DAPI.

FIG. 4A-4D. Efecto de la expresión de Brachyury en la expresión de marcadores de células madre y el crecimiento de linfocitos Tumorales en la mammosfera. Se realizó la PCR en tiempo real para genes indicados en ADNc de (A) células MCF7-pcDNA y MCF7-phBrachyury y (C) células MDA-MB-436-con.ARNhc y MDA-MB-436-Br.ARNhc. Los valores (media ± SEM) se expresan como una relación con el control endógeno *GAPDH*. Se cultivaron mammosferas a partir de los pares de linfocitos Tumorales MCF7 (B) o MD A-MB-436 (D) en placas de

fijación ultra baja. Las mamosferas primarias se disociaron y se volvieron a colocar en placas para cultivos secundarios. Se muestran imágenes de campo brillante de mamosferas con un aumento de 10X y un número medio de mamosferas por campo de microscopio de 10X para cultivos secundarios en los paneles izquierdo y derecho, respectivamente. Las barras de error indican SEM de 8-10 mediciones.

FIG. 5A-5D. Expresión de ARNm de Brachyury en tejidos de carcinoma de mama.

(A) La PCR en tiempo real se realizó para Brachyury, *Twist*, *Snail* y *Slug* en ADNc de tejido tumoral primario de mama humano de 41 pacientes con cáncer de mama. Como controles, también se analizaron 7 muestras de ADNc de mama normal, cada una obtenida de una sección de mama histológicamente normal de una paciente con cáncer o enfermedad fibroquística. (B) Se realizó PCR en tiempo real para Brachyury en ADNc de tejido de tumor de mama primario humano de 107 adenocarcinomas ductales invasivos, 6 adenocarcinomas lobulares invasivos y 5 adenocarcinomas ductales/lobulares mixtos. Como controles, también se analizaron 7 muestras de ADNc de mama normal, cada una obtenida de una sección de mama histológicamente normal de una paciente con cáncer o enfermedad fibroquística. Todos los valores y las medias para cada grupo se expresan como una relación con el control endógeno *GAPDH*. La expresión de Brachyury se muestra para (B) tejidos tumorales primarios de mama de estadios I-III agrupados, (C) tejidos tumorales primarios de mama agrupados por grado de tumor histológico (clasificación de Nottingham), (D) tejidos tumorales primarios de mama agrupados por expresión ER y PR (ER+ PR+ frente a ER-PR-).

FIGS. 6A-6F. Detección inmunohistoquímica de Brachyury en carcinoma primario de mama y tejidos metastásicos. Fotomicrografías de luz transmitida de secciones de tejido teñidas para la expresión de Brachyury en (A) un carcinoma ductal infiltrante primario, Grado 3 (paciente 11); (B) un carcinoma ductal infiltrante primario, Grado 3 y (C) que corresponde a metástasis de ganglios linfáticos del mismo paciente (paciente 6); (D, E) lesiones metastásicas óseas de dos pacientes con cáncer de mama diferentes (pacientes 22 y 23); (F) lesión metastásica cerebral de una paciente con cáncer de mama (paciente 24). La señal marrón representa la tinción para Brachyury. Ampliación 20 X (A-F).

FIG. 7A-7C. Inmunogenicidad de Brachyury. (A) Detección de anticuerpos IgG contra Brachyury en el suero de donantes normales y pacientes con cáncer de mama metastásico. Se muestra el número de casos positivos en cada grupo, estratificados por título de IgG según se determina por ensayo ELISA. Se realizó un análisis estadístico, comparando los donantes de mama frente a los normales. Los CTL específicos de Brachyury se generaron a partir de la sangre periférica de un paciente con cáncer de próstata mediante estimulación con un péptido derivado de Brachyury. Se evaluó la actividad citotóxica en un ensayo de 16 h contra (B) células HLA-A2⁺/Brachyury⁺ MCF7 o células HLA-A27Brachyury⁺ MDA-MB-436, y (C) células HLA-A2⁺/Brachyury⁺ MDA-MB-231. Se indican las relaciones de efector a diana (E: T); se analizó la restricción del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) por pre-incubación de las dianas con IgG de control o un anticuerpo específico de HLA-A.

Descripción detallada

La presente invención proporciona las realizaciones definidas en los artículos 1-11 que aparecen a continuación:

1. Una cantidad eficaz de un vector adenoviral que codifica (a) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 que se une específicamente a la molécula de histocompatibilidad mayor Clase II (MHC); o (b) un polipéptido que comprende al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 que se une específicamente a la molécula de histocompatibilidad mayor Clase II (MHC); para su uso en un método para inducir una respuesta inmune para Brachyury, donde la respuesta inmune comprende una respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury, preferentemente, comprende además una respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de Brachyury, y donde el sujeto es preferentemente un ser humano.
2. La cantidad eficaz del vector adenoviral del artículo 1 para su uso de acuerdo con el artículo 12, que comprende además la medición de la respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury.
3. La cantidad eficaz del vector adenoviral del artículo 1 o 2 para su uso de acuerdo con el artículo 1 o 2, donde el sujeto tiene cáncer y donde el cáncer es preferentemente un cáncer resistente a quimioterapia o un cáncer resistente a radiación.
4. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-3 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-3, donde el polipéptido comprende (a) de 15 a 435 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; o (b) al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1.
5. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-4 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-4, donde el vector adenoviral comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula inmunoestimuladora, donde la molécula inmunoestimuladora se selecciona del grupo que consiste en IL-2, ICAM-1, LFA-3, CD72, GM-CSF, TNF- α , TNF- γ , IL-12 y IL-6.
6. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-5 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-5, que comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un adyuvante, donde el adyuvante es preferentemente quitosano.

7. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-6 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-6, que comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, donde el segundo agente es un agente quimioterapéutico, radiación o una molécula pequeña terapéutica dirigida o anticuerpos monoclonales, preferentemente, el segundo agente es un inhibidor de receptor de factor de crecimiento epitelial, un inhibidor de factor de crecimiento de transformación- β (TGB)- β o un inhibidor de tirosina quinasa.

8. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 1-6 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1-6, donde el vector adenoviral codifica una molécula co-estimuladora, donde la molécula co-estimuladora es preferentemente uno o más entre B7-1, B72, LFA e ICAM-1.

9. La cantidad eficaz del vector adenoviral del artículo 3 para el uso de acuerdo con el artículo 3, donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata o leucemia linfocítica crónica (CLL).

10. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 4-7 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 4-7, donde el método es un método para prevenir cáncer en el sujeto, donde preferentemente, el sujeto está en riesgo de desarrollar cáncer.

11. La cantidad eficaz del vector adenoviral de uno cualquiera de los artículos 4-7 y 10 para el uso de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 4-7 y 10, donde el sujeto tiene una neoplasia intraepitelial prostática de grado alto, poliposis adenomatosa familiar o atipia del pecho.

En el presente documento, se divulga que la proteína Brachyury y los polipéptidos Brachyury de más de 15 aminoácidos de longitud pueden utilizarse para inducir linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury *in vivo* y *ex vivo*. Se divulga asimismo que la proteína Brachyury y los polipéptidos Brachyury pueden utilizarse para estimular la producción de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury y linfocitos T CD8+ específicos de Brachyury. La proteína Brachyury se expresa en numerosos cánceres humanos, como el cáncer de intestino delgado, estómago, vejiga renal, útero, ovario, testículos, pulmón, colon, próstata, tubo bronquial, leucemia linfocítica crónica (CLL), otras neoplasias basadas en linfocitos B y cáncer de mama, como carcinomas ductales infiltrantes de mama y, por lo tanto, el método divulgado en el presente documento puede utilizarse para tratar o prevenir estos cánceres. En ejemplos específicos no exhaustivos, el cáncer de mama es un receptor de estrógeno negativo y un receptor de progesterona negativo para el cáncer de mama. En ejemplos adicionales no exhaustivos, el cáncer es cualquier cáncer que sea resistente a la radiación y/o resistente a la quimioterapia. El cáncer puede expresar Brachyury o tiene el potencial de expresar Brachyury.

Se describen vectores no de levadura, no de pox que codifican una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury, y se divulgan células hospedadoras que expresan Brachyury; estos vectores y células hospedadoras pueden utilizarse para inducir linfocitos T específicos de Brachyury CD4+ y/o linfocitos T CD8+. En algunos ejemplos no exhaustivos, estos vectores son vectores de adenovirus, vectores de alfavirus, vectores de lentivirus, vectores de poliovirus, vectores de *Listeria*, vectores de *Salmonella* o vectores de virus de sarampión. Se divulga asimismo en el presente documento células hospedadoras transformadas con estos vectores y métodos de utilización de estas proteínas, polinucleótidos, vectores y células hospedadoras. En algunos ejemplos, las células hospedadoras son células hospedadoras de *Salmonella* o *Listeria*.

Por lo tanto, se proporcionan métodos para inducir linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+ específicos de Brachyury. Los métodos incluyen el uso de una proteína Brachyury, un polipéptido Brachyury, células dendríticas que expresan epítopos de Brachyury, ácidos nucleicos que codifican proteínas y/o polipéptidos Brachyury, incluyendo vectores no de levadura no de pox que codifican la proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury para inducir la producción de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury. En el presente documento se divulgan métodos para tratar a un sujeto que tiene cáncer, como por ejemplo, pero sin limitación, un cáncer de intestino delgado, estómago, vejiga renal, útero, ovario, testículos, pulmón, colon, próstata, tubo bronquial, leucemia linfocítica crónica (CLL), otras neoplasias malignas de linfocitos B o cáncer de mama, como carcinoma ductal infiltrante o cánceres de mama con receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona negativo. Cualquiera de estos cánceres puede ser resistente a la quimioterapia y/o resistente a la radiación. El cáncer puede expresar Brachyury o tiene el potencial de expresar Brachyury. Se divulgan asimismo métodos para prevenir estos cánceres.

Estos métodos incluyen inducir linfocitos T específicos de Brachyury CD4+; el método también puede incluir inducir linfocitos T específicos de Brachyury CD8+. La proteína Brachyury, el polipéptido Brachyury, las células dendríticas, el ácido nucleico o el vector no de levadura no de pox que codifica la proteína Brachyury se pueden administrar al sujeto solo o en combinación con un segundo agente, como radioterapia y/o quimioterapia.

La proteína Brachyury puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica, o al menos 95 % idéntica, a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1. La proteína Brachyury puede comprender o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 sin la metionina N-terminal, o la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, con sustituciones en la posición 177 (Asp frente a Gly, respectivamente), la posición 368 (Thr frente a Ser, respectivamente) y la posición 409 (Asn frente a Asp, respectivamente).

Un polipéptido Brachyury puede comprender al menos 15 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, como por ejemplo al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, donde la totalidad de la SEQ ID NO: 1 no está incluida en el polipéptido. Un polipéptido Brachyury puede ser de 15 a 100 aminoácidos de SEC ID NO: 1, como por ejemplo de 15 a 200 aminoácidos, de 15 a 300 aminoácidos, de 15 a 400 aminoácidos, o de 15 a 435 aminoácidos de SEC ID NO: 1.

En el presente documento se divulgan métodos para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa en un sujeto. Estos métodos incluyen poner en contacto una célula dendrítica con una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, un polipéptido que comprende al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 que se une específicamente a una molécula de complejo de histocompatibilidad mayor clase II (MHC clase II), o una célula hospedadora de *Listeria* o *Salmonella* que expresa la proteína, preparando así una célula presentadora de antígeno específica. Estos métodos también incluyen administrar la célula presentadora de antígeno al sujeto, induciendo así una respuesta inmune e inhibiendo el crecimiento de la célula cancerosa.

Términos

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se emplean de acuerdo con el uso convencional. Se pueden encontrar las definiciones de biología molecular comunes en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Adenovirus: un virus de la familia *Adenoviridae*, que son virus icosaédricos no envueltos de tamaño mediano (90-100 nm) compuestos por una nucleocápsida y un genoma de ADN lineal de doble cadena. El genoma del adenovirus es un ADN lineal, no segmentado, bicatenario (bc) que tiene entre 26 y 45 kb. Esto permite que el virus lleve teóricamente de 22 a 40 genes. El genoma lineal de ADNbc puede replicarse en el núcleo de las células de mamíferos utilizando la maquinaria de replicación del hospedador. Sin embargo, el ADN adenoviral no se integra en el genoma y no se replica durante la división celular.

Virus adenoasociado: el virus adenoasociado (VAA) es un virus pequeño que infecta a los seres humanos y algunas otras especies de primates. Actualmente, no se sabe que el VAA cause enfermedad y, en consecuencia, el virus causa una respuesta inmune muy leve. El VAA puede infectar tanto a las células en división como a las que no se dividen y puede incorporar su genoma al de la célula hospedadora. El genoma de VAA está construido de ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNmc), con codificación positiva o negativa, que tiene aproximadamente 4,7 kilobase de largo. El genoma comprende repeticiones terminales invertidas (RTI) en ambos extremos de la cadena de ADN y dos marcos de lectura abiertos (ORF): *rep* y *cap*. *Rep* se compone de cuatro genes superpuestos que codifican las proteínas *Rep* necesarias para el ciclo de vida del VAA, y *Cap* contiene secuencias de nucleótidos superpuestas de proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3, que interactúan entre sí para formar una cápside de simetría icosaédrica. Para la terapia génica, las RTI parecen ser las únicas secuencias requeridas en *cis* junto al gen terapéutico: los genes estructurales (*cap*) y de empaquetamiento (*rep*) pueden administrarse en trans.

Adyuvante: un vehículo utilizado para mejorar la antigenicidad. Los adyuvantes incluyen una suspensión de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato) en los que se adsorbe el antígeno; o emulsión de agua en aceite en la que se emulsiona la solución de antígeno en aceite mineral (Adyuvante incompleto de Freund), a veces con la inclusión de micobacterias muertas (adyuvante completo de Freund) para mejorar aún más la antigenicidad (inhibe la degradación del antígeno y/o provoca la entrada de macrófagos). También se pueden utilizar como adyuvantes oligonucleótidos inmunoestimuladores (como los que incluyen un motivo CpG) (por ejemplo, véase la patente estadounidense No. 6.194.388; patente estadounidense No. 6.207.646; patente estadounidense No. 6.214.806; patente estadounidense No. 6.218.371; patente estadounidense No. 6.239.116; patente estadounidense No. 6.339.068; patente estadounidense No. 6.406.705; y patente estadounidense No. 6.429.199). Los adyuvantes incluyen moléculas biológicas (un "adyuvante biológico"), como las moléculas co-estimuladoras. Entre los ejemplos de adyuvantes se incluyen IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L y 4-1 BBL. Otro ejemplo de adyuvante es el quitosano. Otro adyuvante es el adyuvante Bacillus-Calmette-Guerin.

Alfavirus: un virus que pertenece a la familia de virus *Togaviridae* del grupo IV. Los alfavirus son virus pequeños, esféricos, envueltos con un genoma de un solo ARN de cadena codificante positiva. La longitud total del genoma oscila entre 11.000 y 12.000 nucleótidos y tiene una cola de 5' cap y una de poli-A de 3'. Los cuatro genes de proteínas no estructurales están codificados en los dos tercios 5' del genoma, mientras que las tres proteínas estructurales se traducen de un ARNm subgenómico colineal con el tercio 3' del genoma. Los alfavirus incluyen el virus del río Ross, el virus Sindbis, el virus del bosque Semliki y el virus de la encefalitis equina venezolana.

Antígeno: un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluyendo los inducidos por inmunógenos heterólogos. El término "antígeno" incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. "Epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. En una realización, los linfocitos T responden al epítipo, cuando el epítipo se presenta junto con una molécula de MHC. Los epítopos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen normalmente con la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden normalmente con el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye normalmente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, aproximadamente 9, o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única, pero generalmente no tiene más de 20 aminoácidos de longitud. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

Un antígeno puede ser un antígeno específico de tejido o un antígeno específico de enfermedad. Estos términos no son exclusivos, ya que un antígeno específico de tejido también puede ser un antígeno específico de enfermedad. Un antígeno específico de tejido se expresa en un número limitado de tejidos, como pueda ser un solo tejido. Ejemplos específicos y no exhaustivos de un antígeno específico de tejido son un antígeno prostático específico, un antígeno uterino específico y/o un antígeno específico de testículos. Un antígeno específico de tejido puede ser expresado por más de un tejido, como por ejemplo, pero sin limitación, un antígeno que se expresa en más de un tejido reproductivo, como tejido prostático y uterino. Un antígeno específico de la enfermedad se expresa coincidiendo con un proceso de la enfermedad. Entre los ejemplos específicos no exhaustivos de un antígeno específico de la enfermedad se incluyen un antígeno cuya expresión se correlaciona o es predictiva de, formación de tumores, como cáncer de próstata y/o cáncer uterino y/o cáncer de testículos. Un antígeno específico de la enfermedad puede ser un antígeno reconocido por los linfocitos T o las células B.

Amplificación: de una molécula de ácido nucleico (p.ej., una molécula de ADN o ARN) se refiere al uso de una técnica que aumenta el número de copias de una molécula de ácido nucleico en una muestra. Un ejemplo de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa, en la que una muestra biológica recogida de un sujeto se pone en contacto con un par de cebadores oligonucleotídicos, en condiciones que permitan la hibridación de los cebadores a una plantilla de ácido nucleico en la muestra. Los cebadores se extienden en condiciones adecuadas, se disocian de la plantilla y después se vuelven a re-hibridar, se extienden y se disocian para amplificar el número de copias del ácido nucleico. El producto de amplificación puede caracterizarse por electroforesis, patrones de escisión de endonucleasas de restricción, hibridación o ligadura de oligonucleótidos y/o secuenciación de ácidos nucleicos aplicando técnicas convencionales. Otros ejemplos de amplificación incluyen la amplificación por desplazamiento de cadena, tal como se divulga en la patente estadounidense No. 5.744.311; amplificación isotérmica libre de transcripción, tal como se divulga en la patente estadounidense No. 6.033.881; amplificación de reacción en cadena de reparación, tal como se divulga en el documento WO 90/01069; amplificación de la reacción en cadena de ligasa, tal como se divulga en el documento EP-A-320 308; amplificación de reacción en cadena de la ligasa de llenado de huecos, tal como se divulga en la patente estadounidense No. 5.427.930; y amplificación sin transcripción de ARN NASBA™, tal como se divulga en la patente estadounidense 6.025.134.

Anticuerpo: moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunoreacciona con) un antígeno, como por ejemplo la proteína Brachyury.

Un anticuerpo natural (p.ej., IgG, IgM, IgD) incluye cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Sin embargo, se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo natural. Por lo tanto, se pretende que estos fragmentos de unión a antígeno también se designen con el término "anticuerpo". Entre los ejemplos específicos no exhaustivos de fragmentos de unión incluidos en el término anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento F_d que consiste en dominios V_H y C_{H1} ; (iii) un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (iv) un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341: 544-546, 1989) que consiste en un dominio V_H ; (v) una región determinante de complementariedad aislada (CDR); y (vi) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra.

Las inmunoglobulinas y ciertas variantes de las mismas son conocidas y muchas se han preparado en cultivo celular recombinante (p.ej., véase la patente estadounidense No. 4.745.055; la patente estadounidense No. 4.444.487; el documento WO 88/03565; el documento EP 256.654; el documento EP 120.694; el documento EP 125.023; Faoukner et al., *Nature* 298: 286, 1982; Morrison, *J. Immunol.* 123: 793, 1979; Morrison et al., *Ann Rev. Immunol* 2: 239, 1984). Los anticuerpos humanizados y los anticuerpos completamente humanos también se conocen en la técnica.

Animal: organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye mamíferos humanos y no humanos. De manera similar, el término "sujeto" incluye sujetos humanos y veterinarios.

Brachyury: se sabe que el gen Brachyury es importante para el desarrollo del mesodermo durante la gastrulación. Brachyury es el miembro fundador de una familia de factores de transcripción, denominados factores de transcripción de box T, caracterizados por un dominio conservado de unión al ADN (Papaioannou y Silver, *Bioessays* 20 (1): 9-19, 1998), que tiene un papel esencial en la formación y organización del mesodermo en vertebrados (véase, por ejemplo, Kispert y Herrmann, *Embo J* 12 (8): 321 1-20, 1993). Por ejemplo, en *Xenopus*, Brachyury es un gen de respuesta inmediata temprana de inductores de mesodermo, como activina o TGF- β , y la inyección de ARNm de Brachyury en embriones es suficiente para inducir el desarrollo de mesodermo ectópico (Smith et al, *Cell* 67 (1): 79-87, 1991). Además del papel fundamental de las proteínas T-box en el control de los procesos de desarrollo, varios miembros de esta familia parecen estar desregulados en cáncer. Se ha notificado que el gen humano *Tbx2* se amplifica en líneas celulares de cáncer de páncreas (Mahlamakiet al., *Genes Chromosomes Cancer* 35 (4): 353-8, 2002) y se sobreexpresa en tumores de mama mutados BRCA-1- y BRCA-2 (Sinclair et al., *Cancer Res* 62 (13): 3587-9, 2002). Se ha notificado la expresión de Brachyury en líneas de teratocarcinoma humano y cordomas (Vujovic et al, *J Pathol* 209 (2): 157-65, 2006). Se exponen ejemplos de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de Brachyury humano en GENBANK® No. de acceso NP_003172 y GENBANK® No. de acceso. NM_003181, disponible desde el 23 de febrero de 2007, que se proporciona a continuación.

Cáncer de mama: una afección neoplásica del tejido mamario que puede ser benigna o maligna. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal. El carcinoma ductal *in situ* es una afección neoplásica no invasiva de los conductos. El carcinoma lobular no es una enfermedad invasiva, pero es un indicador de que se puede desarrollar un carcinoma. El carcinoma infiltrante (maligno) de mama se puede dividir en fases (I, IIA, IIB, IIIA, IIIB y IV). La estadificación del tamaño tumoral y la estadificación de la implicación ganglionar se pueden combinar en un solo número de estadificación clínica, tal como se ilustra a continuación.

Estadificación del tamaño del tumor	Estadificación de la implicación del ganglio	Etapas clínicas
T1	N0	I
T1	N1	IIA
T2	N0	IIA
T2	N1	IIB
T3	N0	IIB
T1 -T2	N2	IIIA
T3	N1	IIIA
T3	N2	IIIA
T4	N0-N2	IIIB

Los carcinomas de mama pierden la histología y arquitectura típicas de las glándulas mamarias normales. Generalmente, las células de carcinoma sobrepasan el crecimiento de las células normales y pierden su capacidad de diferenciarse en estructuras similares a las glandulares. El grado de pérdida de diferenciación en general está relacionado con la agresividad del tumor. Por ejemplo, el carcinoma "in situ", por definición, retiene la membrana basal intacta, mientras que, a medida que progresa a "invasivo", el tumor muestra ruptura de las membranas basales. Por lo tanto, cabría observar dentro de los carcinomas de mama, la tinción de una capa separada de células basales como se observa en el tejido mamario normal. Para una explicación sobre la fisiología y la histología del cáncer de mama y de mama normal, véase Ronnov-Jessen, L., Petersen, O.W. & Bissell, M.J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stroma reaction. *Physiol Rev* 76, 69-125 (1996).

Los cánceres de mama se pueden dividir en grupos sobre la base de sus perfiles de expresión. Los carcinomas de tipo basal generalmente son negativos para la expresión del receptor de estrógenos (ER) y negativos para la expresión de HER2 (erbB2) y el receptor de progesterona (PR) y, por lo tanto, se denominan "cánceres de mama triple negativos" o "TNBC". Este tipo de cáncer de mama también se denomina ER/HER2/PR⁻ y representa alrededor del 15-20 % de todos los cánceres de mama y, generalmente, no se puede tratar con terapias dirigidas con Her2 o con estrógenos. Se cree que la naturaleza agresiva de este cáncer se correlaciona con un enriquecimiento para células madre cancerosas (CSC) con un fenotipo CD44⁺ CD24^{-lo}. Los carcinomas basales pueden ser negativos para la expresión del receptor de progesterona (PR), positivos para la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y positivos para la expresión de citoqueratina 5 (CK5). Este fenotipo se representa del siguiente modo: ER⁻/PR⁻/HER2⁻/CK5⁺/EGFR⁺.

Cáncer o tumor: Un neoplasma maligno que ha sufrido una anaplasia característica con pérdida de diferenciación, aumento de la tasa de crecimiento, invasión del tejido circundante y con capacidad de metástasis. Por ejemplo, el cáncer de próstata es una neoplasia maligna que surge en tejido prostático o a partir de él, el cáncer de ovario es una neoplasia maligna que se produce en el tejido ovárico o desde él, el cáncer de colon es una neoplasia maligna que se produce en el tejido del colon o desde él, y el cáncer de pulmón es un neoplasia maligna que se produce en

los pulmones. El cáncer residual es el cáncer que permanece en un sujeto después de cualquier forma de tratamiento que se administra al sujeto para reducir o erradicar el cáncer. El cáncer metastásico es un cáncer en uno o más sitios del cuerpo distinto al sitio de origen del cáncer original (primario) del que se deriva el cáncer metastásico. El cáncer incluye pero no se limita a sarcomas y carcinomas. El cáncer de próstata es un tumor maligno, generalmente de origen glandular, de la próstata. Los cánceres de próstata incluyen adenocarcinomas y carcinomas de células pequeñas.

ADNc (ADN complementario): un fragmento de ADN que carece de segmentos internos, no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc se sintetiza en el laboratorio por transcripción inversa del ARN mensajero extraído de las células.

Agentes quimioterapéuticos: cualquier agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular anormal. Dichas enfermedades incluyen tumores, neoplasmas y cáncer, así como enfermedades caracterizadas por un crecimiento hiperplásico como psoriasis. En una realización, un agente quimioterapéutico es un agente de uso en el tratamiento del cáncer de mama y/o próstata. En una realización, un agente quimioterapéutico es un compuesto radioactivo. Las personas expertas en la materia puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico de uso (p.ej., ver Slapak y Kufe, *Principles of Cancer Therapy*, Capítulo 86 Harrison's Principles of Internal Medicine, 14a edición; Perry et al., *Chemotherapy*, Capítulo 17 en Abeloff Clinical Oncology, 2ª ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (eds): *Oncology Pocket Guide to Chemotherapy*, 2ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (eds): *The Cancer Chemotherapy Handbook*, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993). La quimioterapia combinada es la administración de más de un agente para tratar el cáncer, como por ejemplo la administración de un vector no de levadura no de pox que codifica Brachyury en combinación con un compuesto radioactivo o químico a un sujeto.

Variantes conservadoras: las sustituciones de aminoácidos "conservadoras" son aquellas sustituciones que no afectan o disminuyen sustancialmente una actividad o antigenicidad de un epítipo antigénico de Brachyury. Entre los ejemplos específicos y no exhaustivos de una sustitución conservadora se incluyen los siguientes ejemplos:

<u>Restos originales</u>	<u>Sustituciones conservadoras</u>
Al	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu;
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

El término variante conservadora también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original sin sustituir, siempre y cuando los anticuerpos generados para el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido, y/o que el polipéptido sustituido retenga la función del polipéptido sin sustituir. Las sustituciones no conservativas son aquellas que reducen una actividad o antigenicidad.

CD4: Agrupación de factor de diferenciación 4, una proteína de superficie de linfocitos T que media la interacción con la molécula MHC Clase II. CD4 también sirve como el sitio receptor primario para el VIH en los linfocitos T durante la infección por VIH. Las células que expresan CD4 a menudo son linfocitos T auxiliares.

CD8: Agrupación de factor de diferenciación 8, una proteína de superficie de linfocito T que media la interacción con la molécula MHC Clase I. Las células que expresan CD8 son a menudo linfocitos T citotóxicos.

Consiste esencialmente en/consiste en: con respecto a un polipéptido o proteína, un polipéptido (o proteína) que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos especificada si no incluye ningún resto de aminoácido adicional. Sin embargo, el polipéptido (o proteína) puede incluir componentes no peptídicos adicionales, como marcadores (por ejemplo, marcadores fluorescentes, radiactivos o de partículas sólidas), azúcares o lípidos. Con respecto a un polipéptido o proteína, un polipéptido o proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos

especificada no incluye ningún resto de aminoácido adicional, ni incluye componentes no peptídicos adicionales, como lípidos, azúcares o marcadores.

Molécula co-estimuladora: aunque el enganche del TCR con el péptido-MHC entrega una señal al linfocito T, esta señal por sí sola puede ser insuficiente para activar el linfocito T. Las moléculas co-estimuladoras son moléculas que, cuando se unen a su ligando, entregan una segunda señal requerida para que el linfocito T se active. La molécula co-estimuladora más conocida en el linfocito T es CD28, que se une a B7-1 (también llamada CD80) o B7-2 (también conocida como CD86). Una molécula co-estimuladora adicional es B7-3. Las moléculas accesorias que también proporcionan una segunda señal para la activación de los linfocitos T incluyen la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1 e ICAM-2), el antígeno asociado a la función leucocitaria (LFA-1, LFA-2 y LFA-3). Los miembros de la superfamilia de las integrinas y el factor de necrosis tumoral (TNF) también pueden servir como moléculas co-estimuladoras.

Variante degenerada: un polinucleótido que codifica un epítipo de Brachyury que incluye una secuencia que se degenera como resultado del código genético. Hay 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales están especificados por más de un codón. Por lo tanto, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas se incluyen en la presente divulgación siempre y cuando la secuencia de aminoácidos de la proteína Brachyury codificada por la secuencia de nucleótidos no cambie.

Células dendríticas (DC): las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno (APC) que participan en las respuestas inmunes primarias. Las células dendríticas incluyen células dendríticas plasmacitoides y células dendríticas mieloides. Su función principal es obtener el antígeno en los tejidos, migrar a los órganos linfoides y presentar el antígeno para activar los linfocitos T. Las células dendríticas inmaduras se originan en la médula ósea y residen en la periferia como células inmaduras.

Diagnóstico: Identificar la presencia o naturaleza de una afección patológica, como por ejemplo, pero sin limitación, un cáncer, como cáncer de intestino delgado, estómago, riñón, vejiga, útero, ovario, testículos, pulmón, colon o próstata. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de positivos verdaderos). La "especificidad" de un ensayo de diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de falsos positivos se define como la proporción de aquellos sin la enfermedad que dan positivo. Si bien un método de diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico. "Pronóstico" significa predecir la probabilidad de desarrollo (por ejemplo, gravedad) de una patología, como cáncer de próstata o metástasis.

Transición epitelial a mesenquimal: el epitelio es el recubrimiento de las superficies internas y externas del cuerpo, incluyendo el revestimiento de los vasos y otras pequeñas cavidades, que consiste en células unidas por sustancias de cementación biológica. Generalmente, las células epiteliales completamente diferenciadas expresan proteínas características de un fenotipo diferenciado, como la insulina, y tienen una capacidad limitada para proliferar. El mesénquima es la malla de tejido conjuntivo embrionario holgadamente organizado en el mesodermo a partir del cual se forman los tejidos conectivos del cuerpo, junto con los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. La vimentina es un marcador de células mesenquimales. Las células mesenquimales generalmente tienen una mayor capacidad de proliferar *in vitro* que las células epiteliales y no están completamente diferenciadas. Una transición "epitelial a mesenquimal" es un proceso biológico en el que una célula, o una población de células, de un fenotipo epitelial se convierte en un fenotipo mesenquimal menos diferenciado. Una transición de "mesenquimal a epitelial" es un proceso biológico en el que una célula, o una población de células, se convierten de un fenotipo mesenquimal menos diferenciado a un fenotipo epitelial más diferenciado.

Epítipo: un determinante antigénico. Estos son grupos químicos o secuencias peptídicas en una molécula en particular que son antigénicas (que provocan una respuesta inmune específica). Un anticuerpo se une específicamente a un epítipo antigénico particular en un polipéptido. Los epítopos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen normalmente con la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden normalmente con el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5, aproximadamente 9, u 8 a 10 aminoácidos, y generalmente no más de 20 aminoácidos, en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, "Epitope Mapping Protocols" en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996). En una realización, un epítipo se une a una molécula de MHC, como una molécula de HLA o una molécula de DR. Estas moléculas se unen a polipéptidos que tienen los aminoácidos de anclaje correctos separados por aproximadamente ocho a aproximadamente diez aminoácidos, como nueve aminoácidos.

Receptor de estrógeno (ER): un receptor que es activado por la hormona 17 β -estradiol (estrógeno). La función principal del receptor de estrógenos es como un factor de transcripción de unión al ADN que regula la expresión génica. Los receptores de estrógeno se sobreexpresan en alrededor del 70 % de los casos de cáncer de mama,

denominados "ER positivo" o "ER⁺". La terapia para el cáncer de mama ER⁺ implica moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMS) que se comportan como antagonistas de ER en el tejido mamario o inhibidores de la aromatasa. El estado de ER también se utiliza para determinar la sensibilidad de las lesiones de cáncer de mama al tamoxifeno y a los inhibidores de aromatasa.

Secuencias de control de expresión: secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos heterólogos a la que están unidas operativamente. Las secuencias de control de expresión están unidas operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por lo tanto, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de transcripción apropiados, un codón de inicio (es decir, ATG) frente a un gen que codifica la proteína, señal de empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada de ARNm y codones de parada. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya como mínimo componentes cuya presencia puede influir en la expresión y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias asociadas de fusión. Las secuencias de control de expresión pueden incluir un promotor.

Un promotor es una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. También se incluyen aquellos elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente del promotor sea controlable para señales específicas de tipo celular, específicas de tejido o inducibles por señales o agentes externos; dichos elementos pueden estar situados en las regiones 5' o 3' del gen. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo, Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153: 516-544, 1987). Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden utilizarse promotores inducibles tales como pL del bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares. Cuando se clona en sistemas de células de mamíferos, pueden utilizarse promotores derivados del genoma de células de mamíferos (como el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (como la repetición terminal larga del retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus vacuna 7,5 K). En el presente documento, se divulgan también promotores que son eficaces cuando se incluyen en un vector poxviral. También pueden utilizarse promotores producidos por ADN recombinante o técnicas de síntesis para proporcionar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico.

HER2: El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2) también es conocido como Her 2/neu (o ErbB-2, ERBB2). Es miembro de la familia de proteínas ErbB (también conocida como la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico). HER2 también ha sido designado como CD340 (grupo de diferenciación 340) y p185. HER2 destaca por su papel en la patogénesis del cáncer de mama y como objetivo del tratamiento. Es un receptor de tirosina quinasa unido a la superficie de la membrana celular y normalmente está relacionado con las rutas de transducción de señales que conducen al crecimiento y la diferenciación celular.

Aproximadamente el 15-20 por ciento de los cánceres de mama tienen una amplificación del gen *HER2* o una sobreexpresión de su producto proteico. La sobreexpresión de este receptor en el cáncer de mama se ha asociado con un aumento de la recurrencia de la enfermedad y un peor pronóstico. Gracias a su papel pronosticador, los tumores de mama se controlan de rutina en cuanto a la sobreexpresión de HER2. La sobreexpresión también tiene lugar en otros tipos de cáncer como el cáncer de ovario, cáncer de estómago y formas biológicamente agresivas de cáncer de útero, como el carcinoma endometrial seroso uterino.

Heterólogo: que se origina de fuentes o especies genéticas separadas. Un polipéptido que es heterólogo para Brachyury se origina desde un ácido nucleico que no codifica Brachyury. En ejemplos específicos, no exhaustivos, con respecto a un polipéptido que comprende Brachyury, una secuencia de aminoácidos heteróloga incluye una β -galactosidasa, una proteína de unión a maltosa y albúmina, antígeno de superficie de hepatitis B o una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina. Generalmente, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de interés, como Brachyury, no se unirá específicamente a una proteína heteróloga.

Células hospedadoras: células en las que se puede propagar un vector y expresar su ADN. La célula puede ser procariota o eucariota. La célula puede ser de mamífero, como una célula humana. El término también incluye cualquier progenie de la célula hospedadora del sujeto. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica a la célula parental ya que puede haber mutaciones que tienen lugar durante la replicación. Sin embargo, se incluye dicha progenie cuando se utiliza el término "célula hospedadora".

Respuesta inmune: una respuesta de una célula del sistema inmune, como por ejemplo un linfocito B, un linfocito T o un monocito, a un estímulo. La respuesta es específica para un antígeno particular (una "respuesta específica de antígeno"). En una realización, una respuesta inmune es una respuesta de linfocitos T, como una respuesta CD4⁺ o una respuesta CD8⁺. La respuesta es una respuesta de linfocitos B y da como resultado la producción de anticuerpos específicos.

Polipéptido inmunogénico y proteína inmunogénica: una proteína o péptido que comprende un motivo específico de alelo u otra secuencia de modo que el péptido se une a una molécula de MHC e induce una respuesta de linfocitos T o una respuesta de linfocitos B (p. ej., producción de anticuerpos) contra el antígeno.

Los péptidos inmunogénicos son generalmente de una longitud de 7 a 20 aminoácidos, como por ejemplo una longitud de 9 a 12 aminoácidos. En un ejemplo, un polipéptido inmunogénico incluye un motivo específico de alelo u otra secuencia de modo que el péptido se une a una molécula de MHC e induce una respuesta de linfocitos T contra el antígeno (proteína) del que se deriva el polipéptido inmunogénico. Se puede identificar los péptidos inmunogénicos utilizando motivos de secuencia u otros métodos, como redes neuronales o determinaciones polinómicas, conocidas en la técnica. Normalmente, se usan algoritmos para determinar el "umbral de unión" de los péptidos para seleccionar aquellos con puntuaciones que les dan una alta probabilidad de unión a una cierta afinidad y sean inmunogénicos. Los algoritmos se basan en los efectos sobre la unión de MHC de un aminoácido en particular en una posición en particular, los efectos sobre la unión del anticuerpo de un aminoácido en particular en una posición en particular o los efectos sobre la unión de una sustitución en particular en un péptido que contiene un motivo. Dentro del contexto de un péptido inmunogénico, un "resto conservado" es aquel que aparece en una frecuencia significativamente más alta de lo que cabría esperar por distribución aleatoria en una posición en particular en un péptido. Un resto conservado es aquel en el que la estructura de MHC puede proporcionar un punto de contacto con el péptido inmunogénico. En un ejemplo, un "polipéptido Brachyury" inmunogénico es una serie de restos de aminoácidos contiguos de la proteína Brachyury, generalmente de 7 a 20 aminoácidos de longitud, como por ejemplo aproximadamente 8 a 11 restos de longitud. Polipéptidos inmunogénicos de Brachyury específicos tienen 9 o 10 restos de aminoácidos de longitud, o como máximo 12 aminoácidos de longitud.

Los péptidos y proteínas inmunogénicos también se pueden identificar midiendo su unión a una proteína MHC específica (Clase I o Clase II) y por su capacidad para estimular CD4 y/o CD8 cuando se presentan en el contexto de la proteína MHC. Las características de los polipéptidos inmunogénicos se divulgan por ejemplo en el documento publicación PCT No. WO 00/12706.

Generalmente, una proteína Brachyury inmunogénica incluye varios polipéptidos inmunogénicos y puede utilizarse para inducir una respuesta inmune en un sujeto, como una respuesta de linfocitos T CD4+. En un ejemplo, una proteína Brachyury inmunogénica, cuando se une a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, activa los linfocitos T CD4+ contra las células que expresan la proteína Brachyury de tipo silvestre, y/o cuando se une a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, activa linfocitos T citotóxicos (CTL) contra células que expresan la proteína Brachyury de tipo silvestre. La inducción de CTL utilizando péptidos sintéticos y ensayos de citotoxicidad CTL es conocida en la técnica, véase la patente estadounidense 5.662.907.

Composición inmunogénica: una composición, como pueda ser una composición que comprende una proteína Brachyury o un ácido nucleico que codifica la proteína Brachyury, que induce una respuesta medible de linfocitos T contra las células que expresan la proteína Brachyury, o induce una respuesta medible de linfocitos B (como la producción de anticuerpos que se unen específicamente a Brachyury) contra una proteína Brachyury. Para su uso *in vitro*, la composición inmunogénica puede consistir en el ácido nucleico aislado, vector que incluye el ácido nucleico/o la proteína inmunogénica. Para su uso *in vivo*, la composición inmunogénica comprenderá normalmente el ácido nucleico, el vector que incluye el ácido nucleico y/o la proteína inmunogénica, en vehículos farmacéuticamente aceptables y/u otros agentes. Una composición inmunogénica puede incluir opcionalmente un adyuvante, una molécula co-estimuladora o un ácido nucleico que codifica una molécula co-estimuladora.

Molécula inmunoestimuladora: moléculas que estimulan las células del sistema inmune, incluidas moléculas co-estimuladoras, citocinas y ácidos nucleicos inmunoestimuladores, como los que incluyen un motivo CpG.

Inhibición o tratamiento de una enfermedad: la inhibición de una enfermedad, como el crecimiento del cáncer, se refiere a la inhibición del desarrollo completo de una enfermedad. En varios ejemplos, inhibir una enfermedad se refiere a disminuir los síntomas de un cáncer, como pueda ser prevenir el desarrollo del síndrome paraneoplásico en una persona que se sabe que tiene cáncer, o disminuir un signo o síntoma del cáncer o reducir el volumen del cáncer. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o patología relacionada con la enfermedad, como el cáncer.

Aislado: un componente biológico "aislado" (como un ácido nucleico o una proteína o un orgánulo) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se da de forma natural, es decir, otro cromosoma y ADN y ARN extracromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y las proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas a través de métodos de purificación convencionales. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

Marcador: Un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente a otra molécula para facilitar la detección de esa molécula. Entre los ejemplos específicos y no exhaustivos de marcadores se incluyen etiquetas fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos.

Vector lentiviral: los lentivirus son una subclase de retrovirus. Los vectores lentivirales pueden integrarse en el genoma de las células que no se dividen. Esta característica de los lentivirus es única, ya que otros retrovirus pueden infectar solo las células en división. El genoma viral en forma de ARN se transcribe inversamente cuando el

virus entra en la célula para producir ADN, que se inserta después en el genoma en una posición aleatoria mediante la enzima integrasa viral. El vector, llamado ahora provirus, permanece en el genoma y se transmite a la progenie de la célula cuando se divide. Los vectores lentivirales incluyen VIH-1, VIH-2, SIV (virus de la inmunodeficiencia simia), EIAV (virus de la anemia infecciosa equina), FIV (virus de la inmunodeficiencia felina), CAEV (virus de la encefalitis por artritis caprina) y VMV (virus Visna/maedi virus). Los vectores lentivirales abarcan también lentivirus quiméricos derivados de al menos dos lentivirus diferentes.

Secuencia de enlace: una secuencia de enlace es una secuencia de aminoácidos que une covalentemente dos dominios de polipéptido. Pueden incluirse secuencias de engarce entre las proteínas Brachyury divulgadas en el presente documento para proporcionar libertad de rotación a los dominios de polipéptidos unidos. A modo de ejemplo, en una molécula recombinante que comprende dos proteínas Brachyury, se pueden proporcionar secuencias de engarce entre ellas, de modo que las proteínas comprendan proteína Brachyury-engarce-proteína Brachyury. Las secuencias de engarce, que generalmente tienen entre 2 y 25 aminoácidos de longitud, son muy conocidas en la técnica e incluyen, pero sin limitación, cuatro glicinas y un separador de serina descrito por Chaudhary et al., *Nature* 339: 394-397, 1989.

Listeria: un bacilo gram-positivo. El género *Listeria* contiene actualmente siete especies: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*. *L. monocytogenes* es una bacteria intracelular que se ha utilizado como vector para administrar genes *in vitro*.

Linfocitos: un tipo de glóbulo blanco relacionado con las defensas del sistema inmunitario del organismo. Existen dos tipos de linfocitos principales: linfocitos B y linfocitos T.

Complejo mayor de histocompatibilidad (Major histocompatibility complex, MHC): una designación genérica que abarca, según se pretende, los sistemas de antígeno de histocompatibilidad descritos en diferentes especies, incluyendo los antígenos de leucocitos humanos ("HLA").

Mamífero: este término incluye mamíferos humanos y no humanos. De manera similar, el término "sujeto" incluye sujetos humanos y veterinarios.

Neoplasma: una proliferación celular anormal, que incluye tumores benignos y malignos, así como otros trastornos proliferativos.

Oligonucleótido: una secuencia de polinucleótidos lineal de hasta aproximadamente 100 bases de nucleótidos de longitud.

Marco de lectura abierto (ORF): una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación interno. Estas secuencias son generalmente traducibles en un péptido.

Unida operativamente: una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante, como por ejemplo una secuencia que codifica una proteína Brachyury. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificadoras de proteínas, en el mismo marco de lectura.

Modificaciones de péptidos: las proteínas Brachyury incluyen las realizaciones de síntesis de péptidos descritas en el presente documento. Por otra parte, se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento los análogos (moléculas orgánicas no peptídicas), los derivados (moléculas peptídicas funcionalizadas químicamente obtenidas a partir de las secuencias peptídicas divulgadas) y las variantes (homólogos) de estas proteínas. Cada proteína o polipéptido la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos, que puede ser aminoácidos L y/o D, de origen natural y de otro modo.

Las proteínas y los polipéptidos pueden modificarse a través de diversas técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad que los péptidos sin modificar y, opcionalmente, tienen otras propiedades deseables. Por ejemplo, pueden proporcionarse los grupos de ácido carboxílico de la proteína, ya sea carboxilo-terminal o de cadena lateral, en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificarse para formar un éster C₁-C₁₆ o convertirse en una amida de fórmula NR₁R₂ donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o alquilo de C₁-C₁₆, o combinarse para formar un anillo heterocíclico, como por ejemplo un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sea de cadena terminal o lateral, pueden estar en forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, como HCl, HBr, acético, benzoico, toluenosulfónico, maleico, tartárico y otras sales orgánicas, o se puede modificar en alquilo de C₁-C₁₆ o dialquil amino o convertirse adicionalmente en una amida.

Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales del péptido pueden convertirse en alcoxi C₁-C₁₆ o en un éster de C₁-C₁₆ aplicando técnicas perfectamente reconocidas. El fenilo y los anillos fenólicos de las cadenas laterales del

péptido pueden estar sustituidos con uno o más átomos de halógeno, como flúor, cloro, bromo o yodo, o con alquilo de C₁-C₁₆, alcoxi de C₁-C₁₆, ácidos carboxílicos y ésteres del mismo, o amidas de dichos ácidos carboxílicos. Los grupos metileno de las cadenas laterales del péptido pueden extenderse a alquilenos de C₂-C₄ homólogo. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera entre varios grupos protectores perfectamente reconocidos, como los grupos acetamida. Las personas expertas en la materia también reconocerán métodos para introducir estructuras cíclicas en proteínas y polipéptidos para seleccionar y proporcionar limitaciones conformacionales a la estructura que den como resultado una mayor estabilidad.

Se conciben realizaciones peptidomiméticas y organomiméticas, según lo cual la disposición tridimensional de los constituyentes químicos de dichos péptido- y organomiméticos imitan la disposición tridimensional de la cadena principal del péptido y las cadenas laterales de aminoácidos componentes, lo que da como resultado dichos péptido- y organomiméticos de una proteína Brachyury que tiene una capacidad medible o mejorada para generar una respuesta inmune. Para aplicaciones de modelado informáticas, un farmacóforo es una definición tridimensional idealizada de los requisitos estructurales para la actividad biológica. Los péptido- y organomiméticos pueden diseñarse para adaptarse a cada farmacóforo con el software de modelado informático actual (por diseño de medicamentos asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs", en Klegerman & Groves, eds., 1993, *Pharmaceutical Biotechnology*, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pp. 165-174 y *Principles of Pharmacology*, Munson (ed.) 1995, Ch. 102, para descripciones de las técnicas utilizadas en CADD. Se incluyen también miméticos preparados mediante la aplicación de dichas técnicas.

Vehículos farmacéuticamente aceptables: los vehículos farmacéuticamente aceptables de uso son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, de EW Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de las proteínas de fusión aquí descritas.

En general, la naturaleza del portador dependerá del modo de administración que se emplee en particular. Por ejemplo, las formulaciones parenterales generalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (como formas de polvo, píldoras, comprimidos o cápsulas), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se administren pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tampón de pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de una composición o una célula para conseguir un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado. Por ejemplo, puede ser la cantidad de proteína Brachyury o un vector que codifica una proteína Brachyury necesaria para inducir una respuesta inmune, inhibir el crecimiento del cáncer, reducir el volumen del cáncer, prevenir el cáncer o alterar de manera medible los síntomas externos del cáncer. Cuando se administra a un sujeto, generalmente se utilizará una dosis que alcanzará las concentraciones de tejido diana (por ejemplo, en linfocitos) que según se ha demostrado consigue efecto *in vitro*.

Plásmido: una molécula de ADN que está separada y puede replicarse independientemente del ADN cromosómico. Son bicatenarios y, en muchos casos, circulares. Generalmente, se inserta un gen para su replicación en copias de un plásmido que contiene genes que hacen que las células sean resistentes a antibióticos en particular y un sitio de clonación múltiple (MCS o poli-engarce), que es una región corta que contiene varios sitios de restricción comúnmente utilizados que permiten la fácil inserción de fragmentos de ADN en este emplazamiento.

Poliovirus: un enterovirus humano y miembro de la familia de *Picornaviridae*; El poliovirus de tipo silvestre causa poliomieltis. El poliovirus está compuesto por un genoma de ARN y una cápside de proteína. El genoma de tipo silvestre es un genoma de ARN codificante positivo monocatenario que tiene aproximadamente 7500 nucleótidos de longitud. La partícula viral tiene unos 30 nanómetros de diámetro con simetría icosaédrica.

Polinucleótido: el término polinucleótido o secuencia de ácido nucleico se refiere a una forma polimérica de nucleótido de al menos 10 bases de longitud. Un polinucleótido recombinante incluye un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo con las dos secuencias de codificación con las que es inmediatamente contiguo (uno en el extremo 5' y uno en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del cual se deriva. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora a un vector; en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma; o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquiera de los nucleótidos. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

Polipéptido: una cadena de aminoácidos, generalmente, de más de ocho aminoácidos de longitud, como por ejemplo más de quince aminoácidos de longitud, que puede modificarse después de la transducción (p. ej., glicosilación o fosforilación) que no la proteína completa de tipo silvestre. Un polipéptido puede tener al menos 15, al

menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200 aminoácidos en longitud. Por lo tanto, un polipéptido puede ser, por ejemplo, 20-300, 30-300, 40-300, 50-300, 60-300, 70-300, 80-300, 90-300, 100-300 o 200-300 aminoácidos de longitud. El polipéptido es 15 a 10, 20-100, 25-100, 30-100, 35-100, 40-100, 45-100, 50-100, 55-100, 60-100, 65-100, 70-100, 75-100, 80-100, 85-100, 90-100 o 95-100 aminoácidos de longitud. El polipéptido puede ser de hasta 433, 434 o 435 aminoácidos de longitud.

Proteína: una cadena de aminoácidos, generalmente de más de 100 aminoácidos de longitud, que tiene una función específica en una célula y es una proteína de tipo silvestre completa o la proteína de tipo silvestre completa sin la metionina N-terminal. Una proteína puede modificarse después de la transducción. En una realización, la proteína es una proteína Brachyury.

Virus del sarampión (Morbilivirus): un virus de ARN de cadena negativa perteneciente a la familia *Paramyoviridae* que causa el sarampión. Los genes heterólogos pueden insertarse en el genoma viral. El genoma no segmentado del virus del sarampión tiene una polaridad anti-mensaje que da como resultado un ARN genómico que, cuando se purifica, no se traduce ni *in vivo* ni *in vitro* y no es infeccioso.

Poxvirus: cuatro géneros de poxvirus infectan a los seres humanos: ortopox, parapox, yatapox, molluscipox. **Orthopox** incluye el virus de la viruela (variola), el virus de la vacuna, el virus de la viruela bovina y el virus de la viruela del mono. **Parapox** incluye el virus orf, pseudovirus de la viruela bovina y el virus de la estomatitis papular bovina. **Yatapox** incluye el virus tanapox y el virus del tumor de mono yaba. **Molluscipox** incluye el virus del molusco contagioso (MCV). Las partículas virales de *Poxviridae* (viriones) generalmente están envueltas (virión envuelto externamente - EEV), aunque la forma del virus del virión maduro intracelular (IMV), que contiene una envoltura diferente, también es infecciosa.

El virus de la vacuna se utiliza como una herramienta eficaz para la expresión de proteínas heterólogas. El virus de la vacuna penetra en las células principalmente por fusión celular. Este virus contiene tres clases de genes: temprano, intermedio y tardío, que se transcriben mediante la ARN polimerasa viral y los factores de transcripción asociados. El virus de la vacuna replica su genoma en el citoplasma de las células infectadas y, después de la expresión génica tardía, la morfogénesis del virión produce un virión maduro intracelular (IMV) que contiene envoltura, si bien se desconoce aún el origen de la membrana de la envoltura. El IMV se transporta a Golgi, donde se forma el virus de envoltura intracelular (IEV). El IEV se transporta a través de microtubos para alcanzar la periferia de la célula y fusionarse con la membrana plasmática y convertirse en un virus de envoltura asociado a célula (CEV), que desencadena colas de actina en las superficies de la célula o forma el virión de envoltura extracelular (EEV), que, según se cree, es importante para diseminación de largo alcance dentro del organismo hospedador.

Un "vector no poxviral" es un vector que no está incluido en los cuatro géneros de poxvirus.

Receptor de progesterona (PR): un receptor, también conocido como NR3C3 (subfamilia de receptores nucleares 3, grupo C, miembro 3), que es un receptor de esteroides que se une específicamente a progesterona. El receptor de progesterona no se expresa en células de cáncer de mama basales triple negativo.

Sondas y cebadores: una sonda comprende un ácido nucleico aislado unido a un marcador detectable o molécula indicadora. Los cebadores son ácidos nucleicos cortos, preferentemente oligonucleótidos de ADN, de aproximadamente 15 nucleótidos o más de longitud. Los cebadores pueden estar hibridados con una cadena de ADN diana complementaria por hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, y extenderse después a lo largo de la cadena de ADN diana mediante una enzima ADN polimerasa. Los pares de cebadores pueden utilizarse para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica. Las personas expertas en la materia apreciarán que la especificidad de una sonda o cebador particular aumenta con su longitud. Así, por ejemplo, un cebador que comprende 20 nucleótidos consecutivos se hibridará con una diana con una especificidad más alta que un cebador correspondiente de solo 15 nucleótidos. Por lo tanto, para obtener una mayor especificidad, se pueden seleccionar sondas y cebadores que comprenden aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos consecutivos.

Purificado: las proteínas Brachyury y los ácidos nucleicos como se describen en el presente documento pueden purificarse (y/o sintetizarse) a través de cualquiera de los medios conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Guide to Protein Purification*, ed. Deutscher, *Meth. Enzymol* 185, Academic Press, San Diego, 1990; y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer Verlag, Nueva York, 1982). Una purificación sustancial se refiere a la purificación de otras proteínas, ácidos nucleicos o componentes celulares. El término purificado no requiere pureza absoluta, sino que se pretende que sea un término relativo. Una proteína sustancialmente purificada es al menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % pura. Por lo tanto, en un ejemplo específico, no exhaustivo, una proteína sustancialmente purificada está libre en al menos un 90 % de otras proteínas o componentes celulares. En realizaciones adicionales, se purifica un ácido nucleico o preparación celular de modo que el ácido nucleico o la célula represente al menos aproximadamente 60 % (como, por ejemplo, pero sin

limitación, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %) del contenido total de ácido nucleico o celular de la preparación, respectivamente. Por lo tanto, en un ejemplo específico, no exhaustivo, un ácido nucleico sustancialmente purificado está al menos 90 % libre de otros ácidos nucleicos o componentes celulares.

5 **Recombinante:** Un ácido nucleico recombinante es aquel que tiene una secuencia que no se produce naturalmente o tiene una secuencia que se prepara mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de lo contrario. Esta combinación artificial se logra a menudo mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

10 **Replicación defectuosa:** un vector viral que no puede seguir replicando ni empaquetando sus genomas. En un ejemplo no exhaustivo, cuando se infectan las células de un sujeto con un vector, se expresa un heterólogo en el vector en las células del sujeto, sin embargo, debido al hecho de que las células del paciente carecen de genes esenciales. Se pueden citar como ejemplos genes rev y cap para VAA, o gag, pol y env para un
15 lentivirus. Generalmente, los genes necesarios para replicarse y empaquetarse no están presentes, de modo que el virus de tipo silvestre no puede formarse en las células del sujeto.

Salmonella: un género de enterobacterias predominantemente móviles, en forma de barra, gram-negativas, no formadoras de esporas, con diámetros en torno a 0,7 a 1,5 µm, longitudes de 2 a 5 µm, y flagelos que se gradúan en todas las direcciones (es decir, peritricoso). Son los quimioorganotrofos, que obtienen su energía de las reacciones de oxidación y reducción utilizando fuentes orgánicas, y son anaerobios facultativos. La *Salmonella* se puede utilizar como vector de administración de proteínas terapéuticas, incluyendo plásmidos, como por ejemplo con genes tetA truncados en la célula hospedadora. El *S. typhimurium* atenuado puede transformarse con plásmidos de ADN, como por ejemplo, pero sin limitación, pIRES (Invitrogen) y utilizarse como vehículo para el suministro de polipéptidos y
25 proteínas.

Hibridación selectiva: hibridación en condiciones moderadamente o muy estrictas que excluye secuencias de nucleótidos no relacionadas.

30 En las reacciones de hibridación de ácido nucleico, las condiciones utilizadas para lograr un nivel particular de rigurosidad variarán, dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se hibridan. Por ejemplo, pueden considerarse la longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido de GC frente a AT) y el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN frente a ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos al seleccionar las condiciones de hibridación. Una consideración más es si
35 uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.

Un ejemplo específico de condiciones de rigurosidad progresivamente más altas es el siguiente: 2 x SSC/0,1 % SDS a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0,2 x SSC/0,1 % SDS a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de baja rigurosidad); 0,2 x SSC/0,1 % SDS a aproximadamente 42 °C (condiciones de restricción moderadas); y 0,1 x SSC a aproximadamente 68 °C (condiciones de alta rigurosidad). Las personas expertas en la materia pueden determinar fácilmente las variaciones en estas condiciones (p.ej., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). El lavado puede llevarse a cabo utilizando solo una de estas condiciones, p. ej., condiciones de alta rigurosidad, o puede utilizarse cada una de las condiciones, p.ej., durante 10-
45 15 minutos cada una, en el orden mencionado, repitiendo cualquiera o todos los pasos enumerados. Sin embargo, tal como se ha mencionado, las condiciones óptimas variarán dependiendo de la reacción de hibridación implicada en particular y se pueden determinar empíricamente.

Identidad de secuencia: la similitud entre las secuencias de aminoácidos se expresa por lo que respecta a la similitud entre las secuencias, a la que se hace referencia, si no, como identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide con frecuencia por lo que respecta al porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes de una proteína Brachyury poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencia cuando se alinean aplicando los métodos convencionales.

55 Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son muy conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineamiento se describen en: Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; Higgins y Sharp, *Gene* 73: 237, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16: 10881, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444, 1988. Altschul et al., *Nature Genet.* 6: 1 19, 1994, presenta una consideración detallada de los métodos de
60 alineamiento de secuencias y los cálculos de homología.

La herramienta de búsqueda de alineamiento local básica de NCBI (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403, 1990) está disponible desde varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD) y en internet, para su uso en conexión con los programas de análisis de secuencia blastp,
65

blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia empleando este programa está disponible en Internet en el sitio web de NCBI.

Los homólogos y variantes de una proteína Brachyury se caracterizan normalmente por poseer al menos 75 %, por ejemplo al menos 80 %, de identidad de secuencia, o al menos 90 % de identidad de secuencia, contado a lo largo de la alineamiento de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de Brachyury usando el NCBI Blast 2.0, con huecos blastp establecido en los parámetros por defecto. Para las comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función de secuencias Blast 2 utilizando el conjunto de matriz BLOSUM62 para los parámetros por defecto (coste de existencia de huecos de 11 y un coste de espacio por resto de 1). Al alinear péptidos cortos (menos de alrededor de 30 aminoácidos), el alineamiento se debe realizar utilizando la función de secuencias Blast 2, empleando el conjunto matriz PAM30 para los parámetros por defecto (hueco abierto 9, penalizaciones de espacio de extensión 1). Las proteínas con una similitud aún mayor con las secuencias de referencia presentarán identidades de porcentaje crecientes cuando se evalúen a través de este método, como por ejemplo al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia. Cuando se compara menos de la secuencia completa para la identidad de secuencia, los homólogos y variantes normalmente poseerán al menos el 80 % de identidad de secuencia sobre ventanas cortas de 10-20 aminoácidos y pueden poseer identidades de secuencia de al menos 85 % o al menos 90 % o 95 % dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de secuencia en dichas ventanas cortas están disponibles en el sitio web de NCBI en Internet. Las personas expertas en la materia apreciarán que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan únicamente como guía; es totalmente posible que se puedan obtener homólogos sólidamente significativos que estén fuera de los intervalos indicados.

Agente de unión específico: un agente que se une sustancialmente solo a una diana definida. Por lo tanto, un agente de unión específico de Brachyury es un agente que se une sustancialmente a una proteína Brachyury. En una realización, el agente de unión específico es un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a la proteína Brachyury.

Linfocito T: un glóbulo blanco crítico para la respuesta inmune. Los linfocitos T incluyen, pero sin limitación, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. Un linfocito T CD4⁺ es una célula inmune que transporta un marcador en su superficie conocido como "cúmulo de diferenciación 4" (CD4) y está restringido por MHC Clase II. Estas células, se suelen denominar linfocitos T auxiliares, ayudan a orquestar la respuesta inmune, incluyendo las respuestas de anticuerpos y las respuestas de linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T CD8⁺ transportan el marcador "cúmulo de diferenciación 8" (CD8) y están restringidos por MHC de Clase I. En una realización, un linfocito T CD8 es un linfocito T citotóxico. En otra realización, un linfocito CD8 es un linfocito T supresor.

Proteína terapéuticamente activa: un agente compuesto de aminoácidos, como una proteína Brachyury, que provoca la inducción de una respuesta inmune, medida por la respuesta clínica (por ejemplo, aumento de una población de células inmunes, aumento de la actividad citolítica contra las células que expresan Brachyury, o reducción medible de la carga tumoral). Las moléculas terapéuticamente activas también pueden prepararse con ácidos nucleicos. Entre los ejemplos de una molécula terapéuticamente activa basada en ácido nucleico se incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury, donde la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a un elemento de control, como pueda ser un promotor.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición, como pueda ser una proteína Brachyury o un vector que codifica la proteína Brachyury, es una cantidad utilizada para generar una respuesta inmune o para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto. En varios ejemplos, "tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de un cáncer o una reducción en la carga tumoral.

Transducido: una célula transducida es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Tal como se emplea en el presente documento, el término transducción abarca todas las técnicas mediante las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo la transfección con vectores virales, la transformación con vectores plasmídicos y la introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

Vector: una molécula de ácido nucleico tal como se introduce en una célula hospedadora, produciendo así una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula hospedadora, como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Los vectores incluyen vectores plasmídicos, incluyendo plásmidos para expresión en células bacterianas gram negativas y gram positivas. Entre los ejemplos de vectores se incluyen los de expresión en *E. coli* y *Salmonella*. Los vectores también incluyen vectores poxvirales, como por ejemplo, pero sin limitación, retrovirus, ortopox, avipox, viruela aviar, capripox, suipox, adenoviral, virus herpes, virus alfa, baculovirus, virus Sindbis, virus de la vacuna y vectores poliovirus. Los vectores también incluyen vectores para la expresión en células de levadura.

Levadura: microorganismos unicelulares que pertenecen a una de tres clases: Ascomicetos, Basidiomicetos y Hongos Imperfectos. Una levadura puede ser una cepa no patógena como *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas de levadura incluyen *Saccharomyces*, *Candida* (que puede ser patógena), *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Yarrowia*. Los géneros de levadura incluyen *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* o *Schizosaccharomyces*. Las especies de cepas de levadura incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*.

"Vehículos de levadura" incluyen, pero sin limitación, un microorganismo de levadura vivo (entero) intacto (es decir, una célula de levadura que tiene todos sus componentes, incluyendo una pared celular), un microorganismo de levadura intacto eliminado (inactivado) o inactivo o derivados de levadura intacta que incluyendo: un esferoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular), un citoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de pared, núcleo y citoplasma), un fantasma de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de pared, núcleo y citoplasma), un extracto de membrana de levadura subcelular o una fracción del mismo (también denominada partícula de membrana de levadura o una partícula de levadura subcelular), cualquier otra partícula de levadura o una preparación de pared celular de levadura. Un "**vector de no de levadura**" es una composición que no incluye vehículos de levadura.

A no ser que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entienden las personas expertas en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Los términos "un/a", "el/la" en singular incluyen la referencia en plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. El término "comprende" significa "incluye". Del mismo modo, que comprende "A o B" incluye "A", "B" y tanto "A como B". Debe entenderse además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para su descripción. Aunque en la práctica el ensayo de la presente divulgación puede utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen a continuación métodos y materiales adecuados.

Proteína inmunogénica Brachyury y Polipéptidos de Brachyury

Brachyury (también conocida como "proteína T") es una proteína que se transcribe en el mesodermo. En una realización, la proteína Brachyury tiene una secuencia establecida como:

```
MSSPGTESAGKSLQYRVDHLLSAVENELQAGSEKGDPTERELRVGLEESE
LWLRFKELTNEMIVTKNGRRMFVCLKVNVSGLDPNAMYSFLLDFVAADNHRWKYV
NGEWVPGGKPEPQAPSCVYIHPDSPNFGAHWMKAPVSFSKVKLTNKLNGGGQIMLN
SLHKYEPRIHIVRVGGPQRMITSCHCFPETQFIAVTAYQNEEITALKIKYNPFAKAFLDA
KERSDHKEMMEEPGDSQQPGYSQWGWLLPGTSTLCPPANPHPQFGGALSPLSTHSC
DRYPTLRSHRSSPYSPYAHRRNSPTYSDNSPACLSMLQSHDNWSSLGMPAHPSMLP
VSHNASPPTSSSQYPSLWSVSNAGAVTPGSQAVAASNGLGAQFFRGSPAHTPLTHPV
SAPSSSGSPLYEGAAAATDIVDSQYDAAAQGRLIASWTPVSPSPM (SEQ ID NO: 1)
```

(Véase también GENBANK® No. de acceso NP_003172 y GENBANK® No. de Acceso NM_003181, disponible el 23 de febrero de 2007).

Utilizando el código genético, las personas expertas en la materia podrán producir fácilmente una secuencia de ácidos nucleicos que codifica Brachyury. En un ejemplo, la proteína Brachyury está codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia establecida como:

```
tttgcttttg cttatttcg tccatttccc tctctgcgcg cggaccttcc tttccagat ggtgagagcc gcggggacac
ccgacgccgg ggcaggctga tccacgatcc tgggtgtgcg taacgccgcc tggggctccg tggcgaggg acgtgtggg
acaggtgcac cggaaactgc cagactggag agttgaggca tcggaggcgc gagaacagca ctactactgc ggcgagacga
gcgcggcgca tcccaaagcc cggccaaatg cgctctgcc tgggagggga gggaggcgcg cctggagcgg ggacagtctt
ggtccgcgcc ctctcccg gtctgtccg ggaccggga cccgggagcc gtcgcaggtc tcggtccaag gggcccttt
tctcgaagg gcgcgcca agagcaggga aggtgatct caggtagcga gtcgggctt cggggacggc
ggggagggga gccgacggg aggtagct cccctggcac cgagagcgcg ggaagagcc tcagtaccg
agtggaccac ctgctgagcg ccgtggagaa tgagctgcag gcgggcagcg agaaggcgca cccacagag
cgcaactgc gcgtgggct ggaggagagc gagctgtggc tgcgtcaa ggagctacc aatgagatga tcgtgaccaa
gaacggcagg aggtgttcc cgtgtctgaa ggtgaactgt tctggcctgg acccaacgc catgtactcc ttctgtctg
actctgtggc ggcggacaac caccgctga agtacgtgaa cggggaatgg gtgccgggg gcaagccgga
gccgcaggcg cccagctgcg tctacatcca cccgactcg cccaactcg gggccactg gatgaaggct cccgtctct
tcagcaagt caagctcacc aacaagctca acggaggggg ccagatcatg ctgaactct tcataagta tgagcctga
atccacatag tgagagtgg ggtccacag cgcagatga ccagcactg cttccctgag acccagtca tagcgtgac
tgcttatcag aacgaggaga tcacagctct taaaattaag tacaatccat ttgcaaaagc tttccttgat gcaaaggaaa
```

gaagtgatca caaagagatg atggaggaac ccggagacag ccagcaacct gggactctcc aatgggggtg gcttcttct
 ggaaccagca cctgtgtcc acctgcaat cctcatctc agttggagg tgccctctcc ctccctcca cgcacagctg
 tgacaggtac ccaacctga ggagccaccg gtcctaccc taccacagcc cctatgtca tcggaacaat tctcaacct
 attctgaca ctcacctga tgttatcca tctgcaatc ccatgacaat tggccagcc ttggaatgcc tgccatccc
 5 agcatgctcc ccgtgagcca caatgccagc ccacctacca gtcctagca gtacccagc ctgtggtctg tgagcaacgg
 cgccgtcacc ccgggctccc aggcagcagc cgtgtccaac gggctgggg cccagttctt ccgggctcc ccgcgcact
 acacacctt caccatccg gtcctggcg cctctctc gggatccca ctgtacgaag gggcgccgc ggccacagac
 atcgtggaca gccagtacga cggcgagcc caaggccgc tcatagcctc atggacacct gtgtgccac ctccatgtg
 aagcagcaag gccaggtcc cgaaagatgc agtgacttt tctgtggca gccagtgtg actggattga cctactaggt
 10 acccagttgc agtctcaggt taagaaggaa atgcagcctc agtaacttcc tttcaaagc agtggaggag cacacggcac
 ctttccag agccacga tcctgtct acactgcag tagcgtgtc gtccaggtg gcttacagat gaaccaact
 gtggagatga tgcagttgc ccaacctcac tgacgtgaa aaaatgttg ccagggtcca gaaactttt ttggtttat
 tctcatagc tttattgga actttggcac accagaattt gtaactcca ccagtcctac ttagtgaga taaaagcac
 actcttaac tctctctg ttgcttcaa gtattagag ttgagctgt aaggacagaa taaatcata gttgaggaca
 15 gcaggttta ttgaattga aaatttgact gctctgccc ctagaatgtg tttatttaa gcatatgag ctaatctct gtgtgttaa
 actataactg tttcatatt tcttttgac aaagtagcca aagacaatca gcagaaagca ttttgcga aataaacgca
 atatgcaaaa tgtattctg ccagttatta gtgaagcccc tctttgtg agtatttact gtttattg (SEQ ID NO: 2).

En el presente documento se divulga también proteína Brachyury que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica
 20 en al menos un 90 % a SEQ ID NO: 1, por ejemplo, un polipéptido que es al menos o aproximadamente idéntico en
 un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a SEQ ID NO: 1. En el presente documento se
 divulgan proteínas Brachyury que pueden utilizarse para inducir una respuesta inmune (son inmunogénicas), donde
 la proteína Brachyury puede producir una respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury. En algunas
 realizaciones, la proteína Brachyury produce una respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury y una
 25 respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de Brachyury.

La SEQ ID NO: 1 proporciona una secuencia de ejemplo para el Brachyury de longitud completa; otra Brachyury de
 longitud completa es esta secuencia de aminoácidos con la metionina N-terminal eliminada. En algunos ejemplos, la
 proteína Brachyury incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, con sustituciones en la
 30 posición 177 (Asp frente a Gly, respectivamente), la posición 368 (Thr frente a Ser, respectivamente) y la posición
 409 (Asn frente a Asp, respectivamente). Por lo tanto, estas secuencias se pueden utilizar para inducir una
 respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury.

Las posiciones 41 a 223 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 representa el dominio de
 35 unión al ADN de T-box de Brachyury humano, y el dominio T-box en otras secuencias de Brachyury, incluyendo
 secuencias de Brachyury de otras especies, puede identificarse fácilmente en comparación con estas
 secuencias. Tal como se emplea en el presente documento, la referencia a un dominio T-box de una proteína
 Brachyury puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,
 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos consecutivos adicionales de la secuencia de
 40 Brachyury en el extremo N-terminal y/o C-terminal del dominio T-box definido (p. ej., a cada lado de las posiciones
 41-223 de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la proteína Brachyury comprende el dominio T-box de SEQ
 ID NO: 1 e induce una respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury. El polipéptido incluye el dominio de
 unión al ADN T-box o una porción del mismo.

Brachyury humano tiene una homología muy alta con Brachyury de otras especies animales y, por lo tanto, se
 45 pueden utilizar las secuencias de Brachyury de otros organismos, particularmente cuando estas secuencias son
 idénticas, sustancialmente homólogas y provocan una respuesta inmune eficaz contra el antígeno diana (p.ej.,
 Brachyury nativo expresado por una célula tumoral). Por ejemplo, Brachyury murino, clonado por Hermann y sus
 colaboradores en 1990 (Hermann et al., *Supra*), y es aproximadamente idéntico en un 85 % a Brachyury humano a
 50 nivel de nucleótidos. El Brachyury murino es aproximadamente idéntico en un 91 % a Brachyury humano a nivel de
 aminoácidos. Con respecto a Brachyury de otros animales, a nivel de aminoácidos, Brachyury humano es idéntico
 en un 99,5 % a Brachyury de *Pan troglodytes*, 90,1 % idéntico a Brachyury de *Canis lupus familiaris*, 88,5 % idéntico
 a Brachyury de *Bos Taurus*, 92,2 % idéntico a Brachyury de *Rattus norvegicus* y 80,9 % idéntico a Brachyury de
 55 *Gallus gallus*. Los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas Brachyury se pueden utilizar en los vectores
 poxvirales y los métodos divulgados en el presente documento. Generalmente, el dominio T-box de estas proteínas
 Brachyury se incluye en la región de los aminoácidos 1-223. Estos polipéptidos se pueden utilizar para inducir una
 respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury.

El Brachyury de ratón y humano difiere en dos aminoácidos (en las posiciones 26 y 96) en la región T-box. El
 60 Brachyury murino tiene la secuencia de aminoácidos establecida como:

MSSPGTESAGKSLQYRVDHLLSAVESELQAGSEKGDPTRELRVGLEESEL
 WLRFKELTNEMIVTKNGRRMFVLKVNVSGLDPNAMYSFLLDFVTADNHRWKYVN
 LHWVPGGKPEPQAPSCVYIHPDSPNFGAHWMKAPVSFSKVLTNKLNGGGQIMLNS
 LHKYEPRIHIVRGGPQRMITSHCFPETQFIATYQNEETALKIKYNPFAKFLDAK
 65 ERNDHKDVMEEPGDCQQPGYSQWGLVPGAGTLCPPASSHPQFGGSLSLPSTHGCE
 RYPALRNHRSSPYSPYAHNRSSPTYADNMCACLSMLQSHDNWSSLGVPGHSTMLPV

SHNASPPTGSSQYPSLWSVSNGTITPGSQTAGVSNGLGAQFFRGSPAHYTPLTHTVSA
ATSSSSGSPMYEGAATVTDISDSQYDTAQSLLIASWTPVSPPSM (SEQ ID NO: 3, 436 aminoácidos)

Una secuencia de nucleótidos que codifica Brachyury murina es:

5 ggctccgcag agtgaccctt ttcttgga aagcgggtgc gagagaagt aaggtggctg ttgggtagg agtcaagact
cctggaaggt ggagaggtg gcgggaggat gagctgccgggcacagaga gcgcaggga gagcctgcag
taccgagtgg accacgtgct cagcgccgtggagagcgagc tgcaggcggg cagcgagaag ggagacccca
ccgaacgcga actgcgagtg ggcttgagg agagcgagct gtggctgcgc ttcaaggagc taactaacga gatgattg
10 accaagaacg gcaggaggat gtcccggtg ctgaaggtaa atgtgtcagg cctggacccc aatgccatgt actcttctt
gtctgacttc gtgacggctg acaaccaccg ctggaaatat gtgaacgggg agtgggtacc tgggggcaaa ccagagcctc
aggcgccag ctgcgtctac atccaccag actgcccaa tttggggcc cactggatga aggcgctgt gtcttcagc
aaagtcaaac tcaccaacaa gctcaatgga gggggacaga tcatgttaa ctccttgc ataatgaac ctggattca
catcgtgaga gtggggggc gcgaacgat gatcaccagc cactgcttc ccgagaccca gttcatagct gtgactgct
accagaatga ggagattaca gcccttaaaa taaatacaa cccatttgc aaagccttc ttgatgcaa agaaagaaac
15 caccacaag atgtaatgga gcgacgggg gactgcagc agccgggga ttcccaatgg gggggctg ttctgtgctg
tggcaccctc tgcgcgctg ccagctccca cctcagttt ggaggctgc tctctctcc ctccacacac ggctgtgaga
ggtaccagc tctaaggaac caccgtcat cgcctacc cagccctat gctcatgga acagctctc aacctatgc
gacaattcat ctgctgtct gtccatgctg cagtcccatg ataactgtc tagcctcgga gtgcctggc acaccagat
gctgctgtg agtcataacg ccagccacc tactgctct agccagatc ccagctctg gtctgtgagc aatggtacca
20 tcacccagg ctccagaca gctgggtgt ccaacgggt gggagctcag ttcttcgag gctcccctgc acattacaca
ccactgagc acacggctc agctgccag tctctgtct ctggttctc gatgatgaa ggggctgta cagtacaga
catcttgac agccagatg acacggcca aagcctctc atagcctgt ggacacgtg gtcacccca tctatgtaa
ttgaacttc ctcatgtg tgagactgt aacaaccgt gtcaactgga tctttaggc tcaaagtggc aggtcttgg
gacaagggaa aaataataa ataaaagcta gatactaca actccattt caataagag caataataca tgcctataa
25 tcatgttcta cagcctctg ttgatacct acagtagta tatgtgtct acattatga gccaaaggaca gagagacggc
tgtgtgtcag tttttgtga ctggcagta atcagagtc ttgtctagg aggtctctat atctgtgtt tctctacaac atatatgtga
cttgaaatc ctggaattcg tccacccct gtctacttt agtgagacac aaggtacac tcaatgtcc tccctgtt
ccttagagta gtaactttg aggacagaaa aaagcatagc cagaagattg taactgaacc gtcaactgt ctgcccttg
aacaatgcta cttaagcac acgtagctt ttgtgtgg aagtaactg tatgatact ttctgtga caaagtagcc
30 aaagacaatc tgcagaaagt gtttttgc caataaaggc aatatatagc acctgg (SEQ ID NO: 4), véase también las secuencias de
aminoácidos y ácidos nucleicos establecidas en GENBANK® No. de acceso NM_009309 (GI: 118130357), 29 de
octubre de 2011. Las posiciones 41 a 223 de la SEQ ID NO: 4 representan el dominio de unión al ADN T-box de
Brachyury murino. Estas proteínas Brachyury también se pueden utilizar para inducir una respuesta de linfocitos T
específica de Brachyury.

35 La proteína Brachyury incluye, esencialmente consiste, o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos
idéntica en al menos un 90 % a SEQ ID NO: 1, por ejemplo un polipéptido que es aproximadamente 91 %, 92 %,
93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a SEQ ID NO: 1. Las proteínas Brachyury pueden no incluir el
primer aminoácido de SEQ ID NO: 1 (metionina). La proteína Brachyury puede incluir o consistir en los aminoácidos
40 2-435 de SEQ ID NO: 1. La proteína Brachyury puede incluir o consistir en la secuencia de aminoácidos establecida
en SEQ ID NO: 1, con sustituciones en la posición 177 (Asp frente a Gly, respectivamente), la posición 368 (Thr
frente a Ser, respectivamente) y la posición 409 (Asn frente a Asp, respectivamente).

45 La proteína Brachyury puede incluir los aminoácidos 1-15 de SEQ ID NO: 1. La proteína Brachyury puede incluir o
consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3.

Los polipéptidos de Brachyury se utilizan también en los métodos divulgados en el presente documento. Estos
polipéptidos Brachyury incluyen al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al
menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200, o al menos 300, o al menos 400 aminoácidos de
50 una proteína Brachyury, como por ejemplo 435 aminoácidos de una proteína Brachyury. La proteína Brachyury
puede incluir 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300 o 400 aminoácidos de una proteína Brachyury. Un
polipéptido Brachyury puede ser de 15-400, 20-400, 30-400, 40-400, 50-400, 60-400, 70-400, 80-400, 90-400, 100-
400 o 200-400 aminoácidos de una proteína Brachyury. Un polipéptido Brachyury puede ser de 15-300, 20-300, 30-
300, 40-300, 50-300, 60-300, 70-300, 80-300, 90-300, 100-300 o 200-300 aminoácidos de una proteína Brachyury. El
55 polipéptido Brachyury puede ser de 15 a 10-, 20-100, 25-100, 30-100, 35-100, 40-100, 45-100, 50-100, 55-100, 60-
100, 65-100, 70-100, 75-100, 80-100, 85-100, 90-100 o 95-100 aminoácidos de cualquiera de las proteínas
Brachyury divulgadas en el presente documento. El polipéptido Brachyury puede tener 15, 50, 100, 150, 250, 300,
350, 400, 430, 431, 432, 433 o 434 aminoácidos de longitud. El polipéptido Brachyury puede ser de 15-430, 15-431,
15-432, 15-433, 15-434 o 15-435 aminoácidos de longitud. En la FIG. 2 se muestra un ejemplo de polipéptido.

60 Un polipéptido Brachyury puede ser de 15-20 aminoácidos de longitud, como por ejemplo 15-17 aminoácidos de
longitud, como 15, 16, 17, 17, 19 o 20 aminoácidos de longitud y se une a MHC clase II El antígeno MHC de clase II
puede codificarse mediante un alelo HLA-DP, HLA-DR, HLA-B, HLA-DQA1 o HLA-DQB1.

65 En el presente documento se divulga que la proteína Brachyury, los polipéptidos Brachyury, los ácidos nucleicos que
codifican proteínas y polipéptidos Brachyury y los vectores virales no de levadura no de pox que incluyen un

polinucleótido que codifica una proteína Brachyury se pueden utilizar para inducir linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury en un sujeto. En realizaciones adicionales, la proteína Brachyury, el polipéptido Brachyury, el polinucleótido que codifica una proteína o polipéptido Brachyury o el vector no de levadura no de pox incluyen el polinucleótido que induce una respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de Brachyury, o tanto una respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury como una respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de Brachyury.

La proteína o polipéptido Brachyury aislada puede incluirse en una proteína de fusión. Por lo tanto, la proteína de fusión puede incluir la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury (véase lo anterior) y una segunda fracción heteróloga, tal como una proteína myc, una enzima o un portador (como una proteína portadora de hepatitis o albúmina de suero bovino) unidos covalentemente a la proteína o polipéptido Brachyury. Por lo tanto, en varios ejemplos específicos no exhaustivos, la proteína de fusión incluye una proteína Brachyury (o polipéptido Brachyury) y seis restos de histidina secuenciales, una secuencia de aminoácidos de β -galactosidasa y/o una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina.

Las proteínas o polipéptidos Brachyury que están unidos a un portador también se utilizan en los métodos divulgados. Generalmente, un portador es una macromolécula inmunogénica a la que se puede unir una molécula antigénica. Cuando se une a un portador, la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury pasa a ser más inmunogénico. Los portadores se seleccionan para aumentar la inmunogenicidad de la molécula unida y/o para provocar títulos más altos de anticuerpos contra el portador lo cual es beneficioso desde el punto de vista del diagnóstico, analítico y/o terapéutico. La unión covalente de una molécula a un portador puede conferir una potenciación de la inmunogenicidad y dependencia de linfocitos T (véase Pozsgay et al., *PNAS* 96: 5194-97, 1999; Lee et al, *J. Immunol.* 116: 1711-18, 1976; Dintzis et al., *PNAS* 73: 3671-75, 1976). Los vehículos útiles incluyen vehículos poliméricos, que pueden ser naturales (por ejemplo, polisacáridos, polipéptidos o proteínas de bacterias o virus), materiales semi-sintéticos o sintéticos que contienen uno o más grupos funcionales a los que se puede unir una fracción reactiva. Los productos bacterianos y las proteínas virales (como el antígeno de superficie de la hepatitis B y el antígeno del núcleo) también se pueden utilizar como portadores, así como proteínas de organismos superiores, como hemocianina de lapa californiana, hemocianina de cangrejo herradura, edestina, albúminas de suero de mamíferos e inmunoglobulinas de mamíferos. Los portadores adecuados incluyen, pero sin limitación, una proteína de envoltura pequeña de hepatitis B HBsAg. Esta proteína tiene la capacidad de autoensamblarse en agregados y puede formar partículas de tipo viral. La preparación de HBsAg está muy documentada, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente Europea No. EP-A-0 226 846, la publicación de solicitud de patente Europea No. EP-A-0 299 108 y la publicación PCT No. WO 01/117554 y la secuencia de aminoácidos divulgada, por ejemplo, en Tiollais et al., *Nature*, 317: 489, 1985, y la publicación de patente europea No. EP- A-0 278 940 y la publicación PCT No. WO 91/14703.

Por otra parte, solamente puede utilizarse una proteína o polipéptido de Brachyury. Por lo tanto, un segundo resto heterólogo está unido no covalentemente a la proteína o polipéptido Brachyury.

Ácidos nucleicos que codifican proteínas y polipéptidos de Brachyury

Los ácidos nucleicos que codifican una proteína y/o polipéptido Brachyury se pueden producir fácilmente. Estos ácidos nucleicos incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN que codifican el polipéptido Brachyury de interés. Las mutaciones silenciosas en la secuencia de codificación derivan de la degeneración (es decir, redundancia) del código genético, por lo que más de un codón puede codificar el mismo resto de aminoácido. Así pues, por ejemplo, leucina puede ser codificada por CTT, CTC, CTA, CTG, TTA o TTG; serina puede ser codificada por TCT, TCC, TCA, TCG, AGT o AGC; asparagina puede ser codificada por AAT o AAC; ácido aspártico puede ser codificado por GAT o GAC; cisteína puede ser codificada por TGT o TGC; alanina puede ser codificada por GCT, GCC, GCA o GCG; glutamina puede ser codificada por CAA o CAG; tirosina puede ser codificada por TAT o TAC; e isoleucina puede ser codificada por ATT, ATC o ATA. Las tablas que muestran el código genético convencional se pueden encontrar en varias fuentes (p. ej., L. Stryer, 1988, *Biochemistry*, 3ª edición, WH 5 Freeman and Co., NY).

Un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury puede clonarse o amplificarse por métodos *in vitro*, como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia auto-sostenida (3SR) y el sistema de amplificación de replicasa Q β (QB). Por ejemplo, puede aislarse un polinucleótido que codifica la proteína Brachyury por reacción en cadena de la polimerasa de ADNc utilizando cebadores basados en la secuencia de ADN de la molécula. Las personas expertas en la materia conocen perfectamente una amplia variedad de metodologías de clonación y amplificación *in vitro*. Los métodos de PCR se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 4.683.195; Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263, 1987; y Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989). Los polinucleótidos también se pueden aislar seleccionando bibliotecas genómicas o de ADNc con sondas seleccionadas de las secuencias del polinucleótido deseado en condiciones de hibridación rigurosas.

Una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína o polipéptido Brachyury puede unirse operativamente a secuencias de control de expresión. Una secuencia de control de la expresión unida operativamente a una secuencia de codificación está ligada de tal modo que se consigue la expresión de la secuencia de codificación en

condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de expresión incluyen, pero sin limitación, promotores, potenciadores, terminadores de transcripción apropiados, un codón de inicio (es decir, ATG) frente a un gen que codifica proteínas, señal de empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada del ARNm y codones de parada. Los promotores adecuados incluyen, pero sin limitación, un promotor temprano de SV40, un promotor de RSV, un promotor tardío principal de adenovirus, un promotor temprano inmediato 1 de CMV humano, un promotor de poxvirus, promotor 30K, promotor 13, promotor sE/L, promotor 7,5K, promotor 40K y promotor C1. Las vacunas de ADN T se describen en la patente estadounidense No. 5.589.466; patente estadounidense No. 5.973.972. Además de los protocolos de entrega descritos en dichas solicitudes, en las patentes estadounidenses Nos. 4.945.050 y 5.036.006 se describen métodos alternativos de entrega de ADN.

Se han diseñado plásmidos teniendo en cuenta una serie de objetivos, como conseguir un alto número de copias reguladas y evitar posibles causas de inestabilidad de plásmidos en bacterias, y proporcionar medios para la selección de plásmidos que sean compatibles con el uso terapéutico humano. Se ha prestado una particular atención al doble requisito de los plásmidos de terapia génica. En primer lugar, son adecuados para el mantenimiento y la fermentación en *E. coli*, por lo que se pueden producir y purificar grandes cantidades de ADN. En segundo lugar, son seguros y adecuados para su uso en pacientes humanos y animales. El primer requisito requiere plásmidos con alto número de copias que puedan seleccionarse y mantenerse de forma estable con relativa facilidad durante la fermentación bacteriana. El segundo requisito dirige la atención a elementos como puedan ser marcadores seleccionables y otras secuencias de codificación. Los plásmidos que codifican una proteína o polipéptido Brachyury se componen de: (1) un origen de replicación de alto número de copias, (2) un marcador seleccionable, como por ejemplo, pero sin limitación, el gen neo para la selección de antibióticos con canamicina, (3) secuencias de terminación de la transcripción, y (4) un sitio de clonación múltiple para la incorporación de varios casetes de ácido nucleico; y (5) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury.

Existen numerosos vectores plasmídicos conocidos en la técnica para inducir un ácido nucleico que codifica una proteína. Entre ellos se incluyen, pero sin limitación, los vectores divulgados en la patente estadounidense No. 6.103.470; la patente estadounidense No. 7.598.364; la patente estadounidense 7.989.425; y la patente estadounidense No. 6.416.998.

Vectores no de pox, no de levadura

Se pueden utilizar vectores no de levadura no de poxvirus para expresar las proteínas y/o polipéptidos Brachyury divulgados en el presente documento. Estos vectores no son vectores de poxvirus y, por lo tanto, no son vectores de virus ortopox, suipox, avipox o capripox. Orthopox incluye vaccinia, ectromelia y viruela de mapache. Un ejemplo de una ortopox es vaccinia. Avipox incluye viruela aviar, viruela de canario y viruela de paloma. Capripox incluye viruela caprina y viruela ovina. Un ejemplo de un suipox es el vector de la viruela porcina. Ejemplos de vectores virales de viruela para la expresión como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 6.165.460. El genoma del virus vaccinia es conocido en la técnica. Se compone de una región HIND FI 3L, una región TK y una región HA. El virus vaccinia recombinante se ha utilizado para incorporar un gen exógeno para la expresión del producto del gen exógeno (véase, por ejemplo, Perkus et al. *Science* 229: 981-984, 1985; Kaufman et al. *Int. J. Cancer* 48: 900-907, 1991; Moss *Science* 252: 1662, 1991). Baxby y Paoletti (*Vaccine* 10: 8-9, 1992) divulgan la construcción y el uso como vector del poxvirus no replicante, incluyendo el virus de la viruela del canario, el virus de la viruela de las aves y otras especies de aves. Sutter y Moss (*Proc. Natl Acad. Sci EE.UU* 89: 10847-10851, 1992) y Sutter et al. (*Virology* 1994) divulga la construcción y el uso como vector del virus Ankara recombinante no replicante (MVA, vacuna vacunada modificada Ankara) en la construcción y uso de un vector. Estos vectores no se utilizan en los métodos de la presente invención.

Los vectores divulgados en este documento también son vectores no de levadura. Por lo tanto, los vectores divulgados no se utilizan para la expresión en levaduras como *S. cerevisiae* o *Kluyveromyces lactis*. Por lo tanto, los vectores divulgados no incluyen generalmente todos los elementos necesarios para la expresión en levadura. Como ejemplos, se sabe que los promotores son útiles en sistemas de expresión de levadura como los promotores constitutivos de la membrana plasmática H⁺-ATPasa (PMA1), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD), la fosfoglicerato quinasa-1 (PGK1), el alcohol deshidrogenasa-1 (ADH1) y bomba pleiotrópica resistente a fármacos (PDR5). Los promotores no se utilizan en los vectores divulgados en la presente invención. Por otra parte, muchos promotores inducibles, como GAL1-10 (inducido por galactosa), PHO5 (inducido por fosfato inorgánico extracelular bajo) y elementos HSE de choque térmico en tándem (inducidos por la elevación de la temperatura a 37 °C) no se utilizan en los vectores de la presente invención. Los promotores que dirigen la expresión variable como respuesta a un inductor titulable incluyen los promotores MET3 y MET25 sensibles a la metionina y los promotores CUP1 dependientes de cobre; Estos promotores no se utilizan. En ejemplos adicionales, los vectores no incluyen marcadores nutricionales de levadura (como URA3, ADE3, HIS1 y otros) para la selección en levadura.

Se pueden utilizar varios vectores virales no de levadura, no de pox, incluyendo polioma, SV40 (Madzak et al., 1992, J. Gen. Virol, 73: 1533-1536), adenovirus (Berkner, 1992, Cur. Top Microbiol. Immunol., 158: 39-6; Berliner et al., 1988, Bio Techniques, 6: 616-629; Gorziglia et al., 1992, J. Virol, 66: 4407-4412; Quantin et al., 1992,

Proc. Nad. Acad. Sci. EE.UU., 89: 2581-2584; Rosenfeld et al, 1992, Cell, 68: 143-155; Wilkinson et al., 1992, Nucl. Acids Res., 20: 2233-2239; Stratford-Perricaudet y otros, 1990, Hum. Gene Ther., 1: 241-256), virus vaccinia (Mackett et al, 1992, Biotechnology, 24: 495-499), virus adenoasociado (Muzyczka, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol, 158: 91- 123; On et al, 1990, Gene, 89: 279-282), herpes virus que incluye HSV y EBV (Margolskee, 1992, Curr. Top. Microbiol Immunol, 158: 67-90; Johnson et al., 1992, J. Virol, 66: 2952-2965; Fink et al., 1992, Hum. Gene Ther. 3: 11-19; Breakfield y otros, 1987, Mol. Neurobiol, 1: 337-371; Fresse et al., 1990, Biochem. Pharmacol, 40: 2189-2199), virus Sindbis (H. Herweijer et al, 1995, Human Gene Therapy 6: 1161-1167; patentes estadounidenses Nos. 5.091, 309 y 5.227.879), alfavirus (S. Schlesinger, 1993, Trends Biotechnol. 11: 18-22; I. Frolov et al, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 1 1371-1 1377), vectores de herpes virus humanos (HHV) como HHV-6 y HHV-7, y retrovirus de aves (Brandyopadhyay et al, 1984, Mol. Cell Biol, 4: 749-754; Petropoulos et al, 1992, J. Virol, 66: 3391 - 3397), murino (Miller, 1992, Curr. Top. Microbiol Immunol, 158: 1-24; Miller et al., 1985, Mol. Cell Biol, 5: 431-437; Sorge et al., 1984, Mol Cell Biol, 4: 1730-1737; Mann et al, 1985, J. Virol, 54: 401-407) y origen humano (Page et al, 1990, J. Virol, 64: 5370-5276; Buchschalcher et al, 1992, J. Virol, 66: 2731 -2739). Puede utilizarse Baculovirus (virus de polihedrosis multinuclear *Autographa californica*; AcMNPV). Los vectores se pueden obtener de fuentes comerciales (como PharMingen, San Diego, California; Protein Sciences Corp., Meriden, Connecticut; Stratagene, La Jolla, California). Los vectores adecuados se divulgan, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada estadounidense No. 2010/0247486. En ejemplos específicos no exhaustivos, los vectores son vectores de retrovirus (por ejemplo, vectores de lentivirus), vectores de virus del sarampión, vectores de alfavirus, vectores de baculovirus, vectores de virus Sindbis, vectores de adenovirus y poliovirus. Estos vectores incluyen un polinucleótido que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury.

Los vectores no de levadura, no de pox que codifican una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury incluyen al menos un elemento de control de la expresión unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o polipéptido Brachyury. Los elementos de control de expresión se insertan en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Los ejemplos de elementos de control de expresión para su uso en estos vectores incluyen, pero sin limitación, sistema lac, regiones de operador y promotor de fago lambda, promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus o SV40. Los elementos operativos adicionales incluyen, pero sin limitación, secuencia líder, codones de terminación, señales de poliadenilación y cualquier otra secuencia necesaria para la transcripción apropiada y la traducción posterior de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury en el sistema hospedador. El vector de expresión puede contener elementos adicionales necesarios para la transferencia y la replicación posterior del vector de expresión que contiene la secuencia de ácido nucleico en el sistema hospedador. Entre los ejemplos de dichos elementos se incluyen, sin limitación, orígenes de replicación y marcadores seleccionables. Las personas expertas en la materia entenderán además que dichos vectores pueden construirse aplicando métodos convencionales (Ausubel et al., (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Nueva York, NY) y están disponibles en el comercio.

Opcionalmente, el vector puede codificar una o más moléculas inmunoestimuladoras, como IL-2, IL-6, IL-12, LFA (por ejemplo, LFA-1, LFA-2 y/o LFA-3), CD72, RANTES, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , ICAM-1, B7-1, B7-2, otras moléculas relacionadas con B7, OX-40L o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas. Estas moléculas inmunoestimuladoras pueden utilizarse como adyuvantes biológicos (véase, por ejemplo, Salgaller et al, 1998, J. Surg. Oncol. 68 (2): 122-38; Lotze et al., 2000, Cancer J Sci. Am. 6 (Supl. L): S61-6; Cao y cols., 1998, Stem Cells 16 (Supl. L): 251-60; Kuiper y cols., 2000, Adv. Exp. Med. Biol. 465: 381-90). En varios ejemplos, el vector puede codificar IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, B7-1 B7-2, OX-40L, 41 BBL y/o ICAM-1.

Dentro de la técnica se conocen las técnicas básicas para preparar virus de ADN recombinante que contienen una secuencia de ADN heteróloga que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury. Dichas técnicas implican, por ejemplo, la recombinación homóloga entre las secuencias de ADN que flanquean la secuencia de ADN en un plásmido donante y las secuencias homólogas presentes en un virus parental (Mackett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 79: 7415- 7419). En particular, los vectores virales recombinantes se pueden utilizar para entregar el gen. El vector se puede construir, por ejemplo, a través de las etapas conocidas en la técnica, incluyendo el uso de un sitio de endonucleasa de restricción único que está presente de forma natural o se inserta artificialmente en el vector viral parental para insertar el ADN heterólogo que codifica la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury.

Generalmente, un vector donante de ADN contiene los siguientes elementos: (i) un origen de replicación procariota, de modo que el vector puede amplificarse en un hospedador procariota; (ii) un gen que codifica un marcador que permite la selección de células hospedadoras procariotas que contienen el vector (p.ej., un gen que codifica la resistencia a antibióticos); (iii) al menos una secuencia de ADN que codifica la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury situado adyacente a un promotor transcripcional capaz de dirigir la expresión de la secuencia; y (iv) secuencias de ADN homólogas a la región del genoma del virus parental donde se insertarán los genes extraños, flanqueando la construcción del elemento (iii). Los métodos para construir plásmidos donantes para la introducción de múltiples genes extraños en virus virales se describen en la publicación PCT no WO 91/19803.

Generalmente, pueden obtenerse fragmentos de ADN para la construcción del vector donante, incluyendo los fragmentos que contienen promotores transcripcionales y fragmentos que contienen secuencias homólogas a la

región del genoma del virus parental en el que se van a insertar secuencias de ADN extrañas, a partir de ADN genómico o clonarse fragmentos de ADN. Los plásmidos donantes pueden ser mono-, di- o multivalentes (es decir, pueden contener una o más secuencias de ADN extrañas insertadas). El vector donante puede contener un gen adicional que codifica un marcador que permitirá la identificación de virus recombinantes que contienen ADN extraño insertado. Se pueden utilizar varios tipos de genes marcadores para permitir la identificación y el aislamiento de virus recombinantes. Estos incluyen genes que codifican resistencia a antibióticos o productos químicos (p.ej. véase Spyropoulos et al., 1988, J. Virol. 62: 1046; Falkner y Moss, 1988, J. Virol 62: 1849; Franke et al., 1985, Mol. Célula. Biol. 5: 1918), así como genes como el gen lacZ de *E. coli*, que permiten la identificación de placas virales recombinantes por ensayo colorimétrico (Panicali et al., 1986, Gene 47: 193-199).

La secuencia del gen de ADN que se inserte en el virus se puede colocar en un plásmido donante en el que se ha insertado el ADN homólogo para una sección de ADN, como por ejemplo la del sitio de inserción del virus donde se va a insertar el ADN. Independientemente, la secuencia del gen de ADN que se inserte se liga a un promotor. Se sitúa en la construcción del plásmido el enlace promotor-gen de modo que el enlace promotor-gen esté flanqueado en ambos extremos por un ADN homólogo para una secuencia de ADN que flanquea una región de ADN viral que es la región de inserción deseada. Con un vector adenoviral parental, se utiliza un promotor adenoviral. De manera similar, con un vector lentiviral parental, se utiliza un promotor lentivirus. Se amplifica la construcción del plásmido resultante por crecimiento dentro de la bacteria *E. coli* y se aísla. A continuación, se transfecta en un cultivo celular el plásmido aislado que contiene la secuencia del gen de ADN que se va a insertar, junto con el virus parental. La recombinación entre el ADN viral homólogo en el plásmido y el genoma viral, respectivamente, da como resultado un virus recombinante modificado por la presencia de la construcción del gen promotor en su genoma, en un sitio que no afecta la viabilidad del virus.

Tal como se ha señalado anteriormente, se inserta la secuencia de ADN en una región (región de inserción) en el virus que no afecta la viabilidad del virus del virus recombinante resultante. Las personas expertas en la materia pueden identificar fácilmente dichas regiones en un virus, por ejemplo, determinando al azar segmentos de ADN de virus para regiones que permiten la formación recombinante sin afectar seriamente la viabilidad del virus del recombinante.

La recombinación homóloga entre el ADN de plásmido donante y el ADN viral en una célula infectada puede dar como resultado la formación de virus recombinantes que incorporan los elementos deseados. Las células hospedadoras apropiadas para la recombinación *in vivo* son generalmente células eucariotas que pueden infectarse con el virus y transfectarse con el vector plasmídico. Entre los ejemplos de dichas células adecuadas para su uso con vectores virales se incluyen fibroblastos, células HuTK143 (humanas) y células CV-1 y BSC-40 (ambas de riñón de mono). La infección de células con un virus y la transfección de estas células con vectores de plásmido va acompañada de técnicas convencionales en la técnica (véase la patente estadounidense No. 4.603.112 y la publicación PCT No. WO 89/03429). Después de la recombinación *in vivo*, se puede identificar la progenie viral recombinante. Por ejemplo, puede utilizarse la co-integración de un gen que codifica un marcador o gen indicador con el(los) gen(es) extraño(s) de interés, tal como se ha descrito anteriormente, para identificar la progenie recombinante. Un ejemplo específico no exhaustivo de un gen indicador es el gen lacZ de *E. coli*. Pueden seleccionarse los virus recombinantes que expresan beta-galactosidasa utilizando un sustrato cromogénico para la enzima (Panicali et al., 1986, Gene 47: 193). Una vez que se ha identificado un virus recombinante, se puede utilizar una variedad de métodos muy conocidos para analizar por ensayo la expresión de la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury codificado por el fragmento de ADN insertado. Estos métodos incluyen análisis de placa negra (un inmunoensayo enzimático *in situ* realizado en placas virales), análisis de transferencia Western, radioinmunoprecipitación (RIPA) e inmunoensayo enzimático (EIA).

La presente divulgación abarca un vector recombinante que comprende más de un antígeno de interés con el fin de tener una vacuna multivalente. Por ejemplo, los vectores recombinantes, como pueda ser un vector viral, pueden comprender el genoma del virus o porciones del mismo, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un vehículo, como por ejemplo, pero sin limitación antígeno de superficie de la hepatitis B.

Los vectores útiles en los métodos divulgados en el presente documento son vectores no de levadura no de pox virales. Los vectores que son útiles incluyen adenovirus, alfavirus, lentivirus, virus del sarampión y vectores de poliovirus. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a estos tipos de vectores no de pox virales no de levadura. Otros vectores son virus herpes simple, virus del papiloma humano, virus de inmunodeficiencia de Simios, virus del linfoma de linfocitos T humano (HTLV), virus espumoso humano, virus de espuma, retrovirus de tipo B de mamífero, retrovirus de tipo C de mamífero, retrovirus de tipo C aviar, retrovirus de tipo D de mamífero. Los vectores también incluyen vectores del virus Epstein-Barr, vectores del virus de la leucemia murina Moloney, vectores del virus del sarcoma murino Harvey, vectores del virus del tumor mamario murino, vectores del virus del sarcoma de Rous y vectores de plásmidos no virales. A continuación se divulgan varios tipos de vectores de uso. Las composiciones que incluyen estos vectores son útiles para inducir una respuesta de linfocitos T CD4+ a Brachyury y para el tratamiento del cáncer. Estas composiciones también se pueden utilizar para inducir una respuesta de linfocitos T CD8+ a Brachyury.

Vectores de adenovirus

Se pueden producir vectores de adenovirus (Ad) que codifican una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury y que son útiles en los métodos divulgados en el presente documento. Estos vectores son útiles en los métodos divulgados en el presente documento, incluyendo formas de replicación competentes, deficientes en replicación, formas sin intestinos de los mismos y vectores de virus adenoasociados (VAA). Sin pretender vincularse a teoría alguna, se sabe que los vectores de adenovirus exhiben una fuerte expresión *in vitro*, un título excelente y la capacidad de transducir células en división y no en división *in vivo* (Hitt et al., Adv en Virus Res 55: 479-505, 2000). Cuando se utilizan *in vivo* estos vectores conducen a una expresión génica fuerte pero transitoria debido a las respuestas inmunes provocadas en el esqueleto del vector.

Los vectores adenovirales se suelen construir por inserción de un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury en lugar de, o en medio de secuencias virales esenciales como las que se encuentran en la región E1 de adenovirus (Berkner, BioTechniques, 6: 616- 629, 1988; Graham et al., Methods in Molecular Biology, 7: 109-128, Ed: Murcy, The Human Press Inc., 1991). La inactivación de genes virales esenciales, por ejemplo, por supresión o inserción, deshabilita la capacidad de replicación del adenovirus. Para propagar dichos vectores en el cultivo celular, los genes eliminados deben proporcionarse *in trans* (por ejemplo, las proteínas E1A y E1B en el caso de un vector de eliminación E1). Estos adenovirus defectuosos en la replicación se producen en células de empaquetamiento creadas por ingeniería para complementar el virus incompetente en la replicación expresando el subconjunto de elementos genéticos suprimidos de su genoma viral. Los sitios posibles para la inserción de un ácido nucleico de interés, como pueda ser un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury, en vectores adenovirales recombinantes incluyen, sin limitación, la región E1, E2, E3 y E4. En el presente documento se divulga un vector adenoviral recombinante producido a partir de un adenovirus humano que tiene la región E1 suprimida y reemplazada por un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury. El vector viral resultante, con uno o más de sus genes esenciales inactivados, tiene una replicación defectuosa (Statford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy, 1: 241 -256, 1990).

Los vectores de adenovirus recombinantes pueden incluir: (1) un sitio de empaquetamiento que permite que el vector se incorpore en viriones Ad defectuosos en la replicación; y (2) el ácido nucleico que codifica la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury. Otros elementos útiles para la incorporación en viriones infecciosos incluyen Ad RTI 5' y 3'; los genes E2 y E3 pueden incluirse en el vector. En el presente documento se divulga un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury que se inserta en el adenovirus en la región E1A, E1B o E3 suprimida del genoma del virus. En el presente documento se divulgan vectores de adenovirus que no expresan uno o más productos génicos de adenovirus de tipo silvestre, como E1a, E1b, E2, E3, E4. En algunos ejemplos no exhaustivos, los viriones se emplean normalmente junto con líneas celulares de empaquetamiento que complementan las funciones de E1, E2A, E4 y opcionalmente las regiones del gen E3 (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.872.005, 5.994.106, 6.133.028 y 6.127.175. Los vectores de adenovirus se pueden purificar y formular aplicando técnicas conocidas en la técnica.

El empaquetando líneas celulares como puedan ser la línea celular 293 (HEK-293 "o "293") de riñón embrionario humano (Graham et al, J. Gen. Virol., 36: 59-72, 1977) o la línea celular de retinoblastos embrionarios humanos ("HER-911" o "911") (Fallaux et al., Hum. Gene Ther., 7: 215-222, 1996), proporcionan *in trans* la región que falta, como la región E1, de modo que el vector adenoviral suprimido o modificado puede replicarse en dichas células. Los vectores adenovirales adecuados se divulgan, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense No. 20080193484. Los viriones de adenovirus defectuosos en la replicación que encapsulan los vectores de adenovirus recombinantes pueden prepararse a través de técnicas convencionales conocidas en la técnica utilizando células de empaquetamiento y tecnología de empaquetamiento. Se pueden encontrar ejemplos de estos métodos, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 5.872.005.

Los vectores de VAA recombinantes se caracterizan por que son capaces de dirigir la expresión y la producción de los productos transgénicos seleccionados en células objetivo. Por lo tanto, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de VAA esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección de las células diana.

Los viriones recombinantes de VAA (rVAA) pueden construirse de manera que incluyan, como componentes unidos operativamente en la dirección de la transcripción, secuencias de control que incluyen secuencias de iniciación y terminación de la transcripción, y el ácido nucleico que codifica la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury. Estos componentes están unidos en el extremo 5' y 3' por secuencias funcionales de repetición terminal invertida (RTI) de VAA. Por "secuencias funcionales de RTI VAA" se entiende que las secuencias de RTI funcionan según se pretende para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de VAA. Por lo tanto, las RTI de VAA para su uso en los vectores no necesitan tener una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre, y pueden alterarse mediante la inserción, supresión o sustitución de nucleótidos, o las RTI de VAA pueden derivarse de cualquiera de varios serotipos de VAA, siempre y cuando sean funcionales. Un vector VAA es un vector derivado de un serotipo de virus adenoasociado, incluyendo, pero sin limitación, VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7, VAA-8, etc. Los vectores VAA tienen los genes REP y CAP de tipo silvestre eliminados en su totalidad o en

parte, pero retienen secuencias RTI flanqueantes funcionales. Todos estos vectores se pueden utilizar, sin limitación, para la expresión de una proteína Brachyury.

Alfavirus

Se proporcionan alfavirus que codifican proteína Brachyury o polipéptido Brachyury y que son útiles en los métodos divulgados en el presente documento. Los alfavirus son un conjunto de virus transmitidos por artrópodos relacionados serológicamente de la familia Togavirus. Se han clasificado veintiséis virus y subtipos de virus conocidos dentro del género de alfavirus utilizando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Brevemente, la prueba HI segrega los 26 alfavirus en tres complejos principales: el complejo de encefalitis venezolana (VE), el complejo del virus del bosque Semliki (SF) y el complejo de encefalitis occidental (WE). Por otra parte, hay otros cuatro virus, encefalitis oriental (EE), bosque de Barmah, Middelburg y Ndumu, que reciben una clasificación individual basada en el ensayo serológico HI. Entre los ejemplos representativos de alfavirus adecuados se incluyen Aura (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) VR-368), virus Bebaru (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), virus Chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), virus de encefalomiелitis equina occidental (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), virus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), virus Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), virus Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), virus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), Virus del río Ross (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Bosque Semliki (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus Sindbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinita (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), encefalomiелitis equina venezolana (ATCC VR-69), virus de la encefalomiелitis equina venezolana (ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), encefalomiелitis equina occidental (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926) e Y-62-33 (ATCC VR-375), véase patente estadounidense No. 5.843.723.

El vector de alfavirus puede ser un virus Sinbis. Se utilizan construcciones de vector de alfavirus recombinante que incluyen una secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus, una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales de alfavirus, una región de unión viral que se ha inactivado de manera que se evita la transcripción viral del fragmento subgenómico, una secuencia de reconocimiento de ARN polimerasa de alfavirus y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína Brachyury. Las construcciones de vectores de alfavirus que tienen regiones de unión viral inactivadas no transcriben el fragmento subgenómico, lo cual las hace adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones.

Se proporcionan construcciones de alfavirus como pueda ser virus Sinbis que contienen un promotor 5' que es capaz de iniciar la síntesis de ARN viral *in vitro* a partir de ADNc. Los promotores 5' incluyen tanto promotores eucariotas como procariotas, como, por ejemplo, el promotor de β -galactosidasa, el promotor trpE, el promotor lacZ, el promotor T7, el promotor T3, el promotor SP6, el promotor SV40, el promotor CMV y MoMLV LTR. Entre los ejemplos representativos de dichas secuencias se incluyen los nucleótidos 1-60 y, en menor medida nucleótidos 150-210 del virus Sindbis de tipo silvestre, nucleótidos 10-75 para tRNA Asparagina (Schlesinger et al, patente estadounidense No. 5.091.309) y secuencias 5' de otros Togavirus que inician la transcripción.

Los vectores de alfavirus pueden contener secuencias que codifican proteínas no estructurales (NSP) de alfavirus. Como ejemplo, para el virus Sindbis hay cuatro proteínas no estructurales, NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4, que codifican proteínas que permiten que el virus se auto-replique. Las proteínas no estructurales 1 a 3 (NSP1-NSP3) están codificadas por los nucleótidos 60 a 5750 del virus Sindbis de tipo silvestre. Estas proteínas se producen como una poliproteína y luego se escinden en proteínas no estructurales NSP1, NSP2 y NSP3. NSP4. Las construcciones del vector de alfavirus también pueden incluir una región de unión viral que se ha inactivado, de modo que se evita la transcripción viral del fragmento subgenómico. Brevemente, la región de unión viral de alfavirus controla normalmente el inicio de la transcripción del ARNm subgenómico. En el caso del virus Sindbis, la región de unión viral normal se inicia normalmente en aproximadamente el número de nucleótido 7579 y continúa hasta al menos el nucleótido número 7612 (y posiblemente más allá), véase la patente estadounidense No. 5.843.723 para la secuencia completa.

Se pueden utilizar varios miembros del género alfavirus como vectores de expresión de "replicón". Los vectores de replicón se pueden utilizar en cualquiera de varios formatos, incluyendo construcciones de vectores de ADN, vectores de replicón de ARN y partículas de replicón recombinantes (véase más adelante). Entre ellos se incluyen por ejemplo SIN (Xiong et al., Science 243: 1188-1191, 1989; Dubensky et al., J. Virol. 70: 508-519, 1996; Hariharan et al., J. Virol. 72: 950-958, 1998; Polo et al., PNAS 96: 4598-4603, 1999), virus de bosque Semliki (Liljestrom, Bio/Technology 9: 1356-1361, 1991; Berglund et al., Nat. Biotech. 16: 562-565, 1998), VEE (Pushko et al. Virology 239: 389-401, 1997) y quimeras de múltiples alfavirus (patente estadounidense No. 6.376.236; publicación PCT No. WO 20022099035; Perri et al., J. Virol. 77: 10394-10403, 2003).

Las construcciones de vectores de alfavirus también se divulgan en la patente estadounidense No. 5.789.245; patente estadounidense No. 5.843.723; patente estadounidense No. 5.814.482, y patente estadounidense No. 6.015.694; publicación PCT No. WO 00/61772; y publicación PCT No. WO 02/99035. Generalmente, estos vectores incluyen una secuencia 5' que inicia la transcripción de ARN de alfavirus,

una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales de alfavirus, un promotor de la región de unión subgenómica viral que dirige la expresión de una secuencia de ácido nucleico heterólogo adyacente, una secuencia de reconocimiento de ARN polimerasa y un tracto de poliadenilato.

Un alfavirus puede utilizarse como un replicón (una partícula de alfavirus recombinante) que es una partícula de tipo virus que contiene un vector de alfavirus autorreplicante o ácido nucleico "replicón". La partícula de replicón en sí misma se considera generalmente como incompetente o "defectuosa" para la replicación, es decir, no se producirán partículas de replicón de progenie cuando se infecta una célula hospedadora con una partícula de replicón, ya que se suprimen los genes que codifican una o más proteínas estructurales necesarias para el empaquetamiento.

Aunque los vectores de alfavirus pueden utilizarse directamente para administración *in vivo* como ARN, o entregarse como un ADNc basado en plásmido (p. ej., sistema de iniciación de vectores en capas eucariotas), a menudo, para aplicaciones terapéuticas y vacunas *in vivo*, se empaqueta primero el vector replicón de ARN de alfavirus o el ARN replicón en una partícula de tipo virus, que comprende proteínas estructurales de alfavirus (p.ej., proteína de la cápside y glicoproteínas de la envoltura). El alfavirus y los replicones para su uso se divulgan, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense publicada No. 20110002958. Debido a su configuración, los replicones de vector no expresan estas proteínas estructurales de alfavirus necesarias para su empaquetamiento en partículas de replicón de alfavirus recombinante. Por lo tanto, para generar partículas de replicón, las proteínas estructurales deben proporcionarse *in trans*.

El empaquetamiento se puede llevar a cabo a través de diversos métodos, entre los que se incluyen enfoques transitorios como co-transfección de replicón transcrito *in vitro* y ARN(s) auxiliar(es) defectuoso(s) (Liljestrom, Bio/Technology 9: 1356-1361, 1991; Bredenbeek et al., J. Virol. 67: 6439-6446, 1993; Frolov et al., J. Virol. 71: 2819-2829, 1997; Pushko et al., Virology 239: 389-401, 1997; patentes estadounidenses No. 5.789.245 y patente estadounidense No. 5.842.723) o replicón basado en ADN de plásmido y construcciones auxiliares defectuosas (Dubensky et al., J. Virol. 70: 508-519, 1996), así como la introducción de replicones de alfavirus en líneas celulares de empaquetamiento estables (PCL) (Polo et al., PNAS 96: 4598-4603, 1999; patente estadounidense No. 5.789.245; patente estadounidense No. 5.842.723; patente estadounidense No. 6.015.694).

Las metodologías de empaquetamiento *in trans* permiten la modificación de uno o más genes de proteínas estructurales (por ejemplo, para incorporar secuencias de variantes de alfavirus, como por ejemplo mutantes atenuados, véase la patente estadounidense No. 5.789.245; patente estadounidense No. 5.842.723; patente estadounidense No. 6.015.694), seguido de la posterior incorporación de la proteína estructural modificada en las partículas del replicón final. Además, dicho empaquetamiento permite la modificación general de las partículas de replicón de alfavirus mediante el empaquetamiento de una construcción de vector o replicón de ARN derivado de un primer alfavirus utilizando proteínas estructurales derivadas de un segundo alfavirus diferente del de la construcción del vector.

Virus del sarampión

Se proporcionan virus del sarampión que codifican una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury y que son útiles en los métodos divulgados en el presente documento. Las secuencias de ácido nucleico de los virus del sarampión se divulgan en la publicación PCT No. WO 98/13501, que proporciona la secuencia de una copia de ADN del ARN codificante de mensaje de cadena positiva (antigenómica) de varias cepas de sarampión de vacuna de tipo silvestre, incluyendo cepa de tipo silvestre Edmonston, cepa de Moraten y cepa de Schwarz. La publicación PCT No. WO 97/06270 divulga la producción de vectores de sarampión recombinantes.

Se puede utilizar también una cepa atenuada del virus del sarampión para administrar una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury. La forma atenuada del virus Moraten se ha utilizado en todo el mundo como vacuna y tiene un excelente expediente de seguridad (Hilleman, et al., J. Am. Med. Assoc. 206: 587-590, 1968). Por consiguiente, se puede utilizar la cepa Moraten. La vacuna Moraten está disponible en el mercado distribuida por MERCK® y se proporciona liofilizada en un vial que, cuando se reconstituye a 0,5 ml, comprende 10^3 pfu/ml.

Se puede utilizar una la cepa de vacuna contra el virus del sarampión Edmonston-B (MV-Edm) (Enders y Peebles, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 277-286, 1954). MV-Edm crece eficientemente en células tumorales, pero su crecimiento está gravemente restringido en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica humana, fibroblastos dérmicos normales y células vasculares del músculo liso. Está disponible en el mercado una forma de cepa Edmonston atenuada de Enders distribuida por Merck (ATTENUVAX®). También se pueden utilizar otras cepas atenuadas del virus del sarampión, como las cepas Leningrado-16 y Moscú-5 (Sinitsyna, et al., Res. Virol. 141 (5): 517-31, 1990), cepa Schwarz (Fourrier, et. al., Pediatric 24 (1): 97-8, 1969), cepa 9301 B (Takeda, et al. J. VIROL. 72/1 1: 8690-8696), la cepa AIK-C (Takehara, et al., Virus Res 26 (2): 167-75, 1992), así como las descritas en Schneider-Shaulies, et al., PNAS 92(2): 3943-7, 1995).

La secuencia de nucleótidos del virus del sarampión recombinante puede comprender un replicón que tiene un número total de nucleótidos que es un múltiplo de seis. La "regla del seis" se expresa en el hecho de que el número

total de nucleótidos presentes en el ADNc recombinante finalmente asciende a un número total de nucleótidos que es un múltiplo de seis, una regla que permite la replicación eficiente del ARN del genoma de los virus del sarampión.

El ADN heterólogo, como pueda ser un ácido nucleico que codifica la proteína Brachyury, se clona en el virus del sarampión dentro de una Unidad de Transcripción Adicional (ATU) insertada en el ADNc que corresponde al ARN antígeno del virus del sarampión. La localización de la ATU puede variar a lo largo del ADNc: sin embargo, se está situada en un sitio de modo que se beneficie del gradiente de expresión del virus del sarampión. Por lo tanto, la ATU puede extenderse a lo largo del ADNc. La ATU se inserta en la porción N-terminal de la secuencia y especialmente dentro de la región aguas arriba del gen L del virus del sarampión y aguas arriba del gen M del virus. En otras realizaciones, la ATU se inserta corriente arriba del gen N del virus, véase la solicitud de patente publicada estadounidense No. 2011/0129493. Es posible dirigirse a los cistrones en el genoma del virus del sarampión en particular para modificar los genes cuya expresión está asociada con la atenuación (Schneider-Shaulies et al. PNAS 92(2): 3943-7, 1995; Takeda, et al. J. Virol. 72/11: 8690-8696, 1998). Por lo tanto, se genera una cepa de virus de sarampión recombinante que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury en cualquiera entre una proteína H, una proteína V, una proteína C y combinaciones de las mismas.

Los vectores recombinantes del virus del sarampión incluyen el plásmido pTM-MV Schw que contiene el ADNc derivado de la transcripción inversa del ARN antígeno del virus del sarampión y una secuencia de control de expresión adaptada que incluye un promotor y un terminador para la polimerasa T7. Se describen también vectores, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada estadounidense No. 2006/0013826. Estos vectores son útiles en los métodos divulgados en el presente documento.

Se pueden producir cepas atenuadas adicionales del virus del sarampión que expresan una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury. Las cepas atenuadas de virus se obtienen por paso en serie del virus en cultivo de células (p. ej., en células no humanas), hasta que se identifica un virus que es inmunogénico pero no patógeno. Si bien el virus de tipo silvestre cause una infección fatal en los titíes, las cepas de vacuna no. Los individuos que reciben una vacuna atenuada contra el virus del sarampión no presentan síntomas clásicos de sarampión. La atenuación se asocia con una disminución de la replicación viral (medida *in vivo* por la incapacidad de causar sarampión en los monos), una disminución de la viremia y la falta de inducción de efectos citopatológicos en los tejidos (p. ej., fusión célula-célula, células multinucleadas). Véase la patente estadounidense No. 7.393.527.

Se puede producir una dosis eficaz de un virus del sarampión atenuado que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury infectando una célula primaria o una línea celular continua con un inóculo inicial de una reserva que comprende una cepa Moraten atenuada del virus del sarampión (o un inóculo de una reserva de MMR) o la cepa MV-Edm o cualquiera de las otras cepas que se han descrito y expandiendo el virus después del pase en serie. Las células o líneas celulares incluyen, pero sin limitación, células de riñón o testículo de mono o líneas celulares de mono (por ejemplo, Vero, KB, CV-1, BSC-1 y similares). La replicación viral en las células se observa como la fusión célula-célula y la formación de sincitios.

Se expande el virus del sarampión atenuado hasta que se obtiene una concentración de dosis deseada en medios de cultivo de células normales. La concentración de dosis terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 10^3 a 10^{12} pfu. La concentración es de aproximadamente 10^5 a 10^8 pfu. Se puede determinar por ensayo el título viral inoculando células (p. ej., células Vero) en placas de cultivo (p. ej., placas de 35 mm). Al cabo de 2-3 horas de adsorción viral, se extrae el inóculo y se superpone sobre las células una mezcla de medio de cultivo celular y agarosa o metilcelulosa (p. ej., 2 ml de DMEM que contiene 5 % de FCS y 1 % de agarosa SeaPlaque). Al cabo de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días, se fijan los cultivos con 1 ml de ácido trifluoroacético al 10 % durante aproximadamente 1 hora, después se reticulan por UV durante 30 minutos. Después de eliminar la capa de agarosa, se tiñen las monocapas celulares con cristal violeta y se hace el recuento de las placas para determinar el título viral. Se recoge el virus de la sincitia celular raspando células de los platos, sometiéndolas a congelación/descongelación (p. ej., aproximadamente dos rondas) y centrifugando. Los sobrenadantes aclarados representan el virus "purificado en placa".

Las reservas virales se producen por infección de monocapas celulares (p. ej., adsorción durante aproximadamente 1,5 horas a 37 °C), seguido de raspado de células infectadas en un medio adecuado (p. ej., Opti-MEM, Gibco-BRL) y lisis por congelación/ descongelación (p. ej., 2 rondas). Se reparten en partes alícuotas las reservas virales, se congelaron y almacenaron a 70 °C-80 °C y se pueden almacenar a concentraciones superiores a la dosis terapéuticamente eficaz. La reserva viral se almacena en una solución estabilizante. Las soluciones estabilizadoras son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 4.985.244, y la patente estadounidense No. 4.500.512.

Poliovirus

Se proporcionan poliovirus que codifican una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury y que son útiles en los métodos divulgados en el presente documento. Se ha clonado y secuenciado el genoma del poliovirus completo y se han identificado las proteínas virales. También está disponible un ADNc de poliovirus infeccioso que ha permitido una manipulación genética del virus adicional (Racaniello VR et al., Science 214 (4542) 916-919, 1981). La molécula

de ARN genómico de tipo silvestre tiene 7433 nucleótidos de longitud, poliadenilada en el extremo 3' y tiene una pequeña proteína viral unida covalentemente (VPg) en el terminal 5' (Kitamura N et al., Nature 291: 547-553; 1981; Racaniello VR et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78: 4887-4891, 1981). La expresión del genoma del poliovirus se produce a través de la traducción de una sola proteína (poliproteína) que es procesada posteriormente por las proteasas codificadas por el virus (2A y 3C) para dar las proteínas maduras estructurales (cápside) y no estructurales (Kitamura N et al., Nature 291: 547-553, 1981; Koch F et al., The Molecular Biology of Poliovirus, Springer-Verlag, Viena, 1985). La replicación del poliovirus es catalizada por la ARN polimerasa dependiente de ARN codificada por el virus, que copia el ARN genómico para dar una molécula de ARN complementaria, que luego sirve como plantilla para una mayor producción de ARN (Koch F et al., Supra; Kuhn RJ et al., en DJ Rowlands et al. (ed.) Molecular Biology of Positive Strand RNA virus, Academic Press Ltd., Londres, 1987). La traducción y el procesamiento proteolítico de la poliproteína de poliovirus se describe en Nicklin MJH et al., Bio/Technology 4:33-42, 1986.

El genoma de ARN viral codifica las proteínas necesarias requeridas para generar ARN de progenie nueva, así como la encapsidación de los nuevos genomas de ARN. *In vitro*, el poliovirus es lítico, con el resultado de la completa destrucción de las células permisivas. Dado que el ciclo de replicación viral no incluye ningún producto intermedio de ADN, no hay posibilidad de integración de ADN viral en el ADN cromosómico del hospedador.

Los primeros estudios identificaron tres tipos de poliovirus basados en la reactividad a anticuerpos (Koch F et al., Supra, 1985). Estos tres tipos serológicos, designados como tipo I, tipo II y tipo III, se han distinguido además por tener numerosas diferencias de nucleótidos, tanto en las regiones no codificantes como en las regiones codificantes de las proteínas. Las tres cepas son adecuadas para su uso en la entrega de proteínas heterólogas. Por otra parte, también hay versiones atenuadas disponibles de las tres cepas de poliovirus.

Los replicones pueden comprender ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Los replicones son polinucleótidos a base de poliovirus que carecen de un ácido nucleico de poliovirus de tipo silvestre necesario para la encapsidación del virus. En consecuencia, los replicones recién encapsidados no pueden producirse después de la entrada inicial de la célula en ausencia del ácido nucleico que falta. Los replicones pueden carecer de este ácido nucleico como resultado de cualquier modificación del ácido nucleico de poliovirus de tipo silvestre, incluyendo, pero sin limitación, supresiones, inserciones y sustituciones, incluyendo una inserción de un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury. Los replicones de poliovirus carecen de un ácido nucleico de poliovirus de tipo silvestre que codifica al menos una porción de una proteína que se requiere para la encapsidación. Las proteínas necesarias para la encapsidación del replicón incluyen proteínas que forman parte de la estructura de la cápside. Entre los ejemplos de dichas proteínas se incluyen aquellas codificadas por los genes VP1, VP2, VP3 y VP4 de la región precursora de la cápside PI del poliovirus, la proteína Vpg y aquellas proteínas que son necesarias para el procesamiento apropiado de las proteínas estructurales de la estructura de la cápside, como puedan ser las proteasas responsables de la escisión de la poliproteína viral. Por lo tanto, el vector de poliovirus carece de secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más de los genes VP1, VP2, VP3 y VP4, de la región precursora de la cápside PI de poliovirus, la proteína Vpg y codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury.

Los replicones se introducen normalmente en una célula en forma de ARN. Los replicones encapsidados pueden entrar en las células a través de la interacción de las proteínas de la cápside con el receptor de poliovirus. Los replicones son totalmente capaces de replicar el ARN (amplificación) tras la introducción en las células y la traducción, en el marco de lectura correcto, de la poliproteína única a través de la cual se produce la expresión del genoma completo del replicón. La traducción de las secuencias de replicones puede ser transitoria, y generalmente dura solo unas 24-48 horas. Se pueden acumular altos niveles de proteínas codificadas por replicón durante el período de traducción. Los replicones encapsidados pueden entrar en las células a través de la interacción de las proteínas de la cápside con la proteína hPVR.

Los replicones comprenden ARN, que incluyen secuencias que codifican la proteína Brachyury y están encapsidados. En algunos ejemplos, los replicones tienen una supresión del gen de la cápside (PI) y se derivan del genoma de ARN del poliovirus tipo 1, tipo 2, tipo 3 o combinaciones de los mismos. Asimismo, un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury puede sustituir parte o la totalidad del gen de la cápside (PI) de modo que la porción del gen de la cápside (PI) que queda, si existe, es insuficiente para soportar la encapsidación *in vivo*. En general, el término "replicones de PI" se refiere a replicones en los que todo el ácido nucleico que codifica la proteína precursora de la cápside de PI se ha suprimido o alterado de modo que las proteínas que están codificadas normalmente por este ácido nucleico no se expresan o se expresan en una forma no funcional. Las proteínas que normalmente están codificadas por la región precursora de la cápside PI del genoma del poliovirus incluyen las proteínas codificadas por los genes VP1, VP2, VP3 y VP4. Los replicones PI, por lo tanto, carecen de los genes VP1, VP2, VP3 y VP4 o comprenden formas inexpresables o no funcionales de los genes VP1, VP2, VP3 y VP4. Los replicones pueden incluir un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury sustituido por los genes VP1, VP2, VP3 y VP4.

Se pueden producir replicones encapsidados introduciendo tanto un replicón como un vector de expresión complementario que proporciona el ácido nucleico que falta necesario para la encapsidación en trans a una célula hospedadora. Un "vector de encapsidación de replicón" se refiere a un vector no basado en poliovirus que

comprende un ácido nucleico requerido para la encapsidación de replicón y que proporciona el ácido nucleico requerido (o proteína codificada) en trans. Los vectores de encapsidación de replicón se pueden introducir en una célula hospedadora antes, simultáneamente o después de la introducción del replicón. Los métodos adecuados para la encapsidación se divulgan en la patente estadounidense No. 6.680.169. Los métodos que pueden utilizarse para preparar replicones encapsidados se han descrito en Porter DC et al., J. Virol. 67: 3712-3719, 1993; Porter DC et al. 1995, J. Virol. 69: 1548-1555, 1995; publicación PCT No. WO 96/25173; patente estadounidense No. 5.614.413, patente estadounidense No. 5.817.512; Pat. N° 6.063.384; y patente estadounidense No. 6.680.169.

Los replicones no encapsidados pueden entregarse directamente a las células diana, por ejemplo por inyección directa, por ejemplo, en células musculares (véase, por ejemplo, Acsadi G et al., Nature 352 (6338): 815-818, 1991; Wolff JA et al., Science 247: 1465-1468, 1990), o por electroporación, transfección mediada por fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas o captación de ácido nucleico mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu G et al., J. Biol. Chem. 263: 14621-14624, 1988; Wilson JM et al., J. Biol. Chem. 267: 963-967, 1992; y la patente estadounidense No. 5.166.320) u otros métodos para entregar ácidos nucleicos desnudos a células diana.

Vectores retrovirales

Se proporcionan vectores retrovirales, incluyendo vectores lentivirales que codifican una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury y que son útiles en los métodos divulgados en el presente documento. Se ha analizado los vectores retrovirales y se ha observado que son vehículos de entrega adecuados para la introducción estable de una serie de genes de interés en el ADN genómico de una amplia gama de células diana. Sin vincularse a teoría alguna, la capacidad de los vectores retrovirales para entregar transgenes de una sola copia no reordenados en las células hace que los vectores retrovirales sean muy adecuados para transferir genes a las células. Además, los retrovirus entran en las células hospedadoras mediante la unión de las glicoproteínas de la envoltura retroviral con receptores específicos de la superficie celular en las células hospedadoras. En consecuencia, pueden utilizarse también vectores retrovirales pseudotipificados en los que se reemplaza la proteína de envoltura nativa codificada por una proteína de envoltura heteróloga que tiene una especificidad celular diferente a la proteína de envoltura nativa (p.ej., se une a un receptor de superficie celular diferente en comparación con la proteína de envoltura nativa).

Generalmente, los retrovirus contienen tres dominios principales de codificación, gag, pol, env, que codifican las proteínas esenciales del virión. Los vectores retrovirales son útiles en donde gag, pol y/o env están ausentes o no son funcionales. Los vectores retrovirales se divulgan, por ejemplo, en la publicación de patente publicada estadounidense No. 20060286634.

Por lo tanto, se proporcionan vectores retrovirales que incluyen por ejemplo vectores de transferencia retrovirales que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury y vectores de empaquetamiento retrovíricos que comprenden uno o más elementos de empaquetamiento. En el presente documento se divulgan vectores retrovirales pseudotipificados que codifican una proteína de envoltura heteróloga o funcionalmente modificada para producir retrovirus pseudotipificados.

Hay muchos retrovirus y entre sus ejemplos se incluyen: virus de la leucemia murina (MLV), lentivirus como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), virus del tumor mamario de ratón (MMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), virus del osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), virus de la mielocitosis aviar 29 (MC29) y virus de la eritroblastosis aviar (AEV). Otros retrovirus adecuados para su uso incluyen, pero sin limitación, virus de leucosis aviar, virus de leucemia bovina, virus inductor de foco de células de visón. La secuencia central de los vectores retrovirales se puede derivar de una amplia variedad de retrovirus, que incluyen, por ejemplo, retrovirus de tipo B, C y D, así como espumavirus y lentivirus (véase RNA Tumor Viruses, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Un ejemplo de un retrovirus adecuado para su uso en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento incluye, pero sin limitación, un lentivirus.

Un lentivirus es un virus de inmunodeficiencia humana (VIH), por ejemplo, tipo 1 o 2 (es decir, VIH-1 o VIH-2). Otros vectores de lentivirus incluyen el virus Visna/maedi de oveja, el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), el lentivirus bovino, el virus de inmunodeficiencia simia (SIV), un virus de anemia infecciosa equina (EIAV) y un virus de encefalitis por artritis caprina (CAEV).

Los lentivirus comparten varias proteínas estructurales de virión en común, incluyendo las glicoproteínas de envoltura SU (gp120) y TM (gp41), que están codificadas por el gen env; CA (p24), MA (p117) y NC (p7-11), que están codificadas por el gen gag; y RT, PR e IN codificadas por el gen pol. VIH-1 y VIH-2 contienen proteínas accesorias y otras que participan en la regulación de la síntesis y el procesamiento del ARN del virus y otras funciones implicativas. Las proteínas accesorias, codificadas por los genes vif, vpr, vpu/vpx y nef, se pueden omitir (o inactivar) del sistema recombinante. Por otra parte, tat y rev se pueden omitir o inactivar, como por mutación o supresión.

Sin vincularse a teoría alguna, el uso de técnicas de transferencia de genes basadas en lentivirus depende generalmente en la producción *in vitro* de partículas lentivirales recombinantes que llevan un genoma viral altamente suprimido en el que se acomoda un gen de interés, como pueda ser un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury. En particular, los lentivirus recombinantes se recuperan a través de la co-expresión en trans en una línea celular permisiva de (1) las construcciones de empaquetamiento, es decir, un vector que expresa los precursores de Gag-Pol junto con Rev (expresado alternativamente en trans); (2) un vector que expresa un receptor de envoltura, generalmente de naturaleza heteróloga; y (3) el vector de transferencia, que consiste en el ADNc viral privado de todos los marcos de lectura abiertos, pero que mantiene las secuencias requeridas para la replicación, la encapsidación y la expresión, en el que se insertan las secuencias para su expresión. El vector lentiviral lentígeno descrito en Lu, X. et al. Journal of gene medicine 6:963-973, 2004 puede utilizarse para expresar la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury. Los vectores lentivirales adecuados se divulgan también, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada estadounidense No. 20100062524.

Los sistemas de empaquetamiento retrovítico para generar células productoras y líneas de células productoras que producen retrovirus, así como los métodos para fabricar dichos sistemas de empaquetamiento son conocidos en la técnica. Generalmente, los sistemas de empaquetamiento retrovítico incluyen al menos dos vectores de empaquetamiento: un primer vector de empaquetamiento que incluye una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gag, un pol o genes gag y pol; y un segundo vector de empaquetamiento que incluye una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen de envoltura heterólogo o funcionalmente modificado. Los elementos retrovirales se pueden derivar de un lentivirus, como VIH. Estos vectores pueden carecer de un gen tat funcional y/o genes accesorios funcionales (vif, vpr, vpu, vpx, nef). El sistema puede comprender además un tercer vector de empaquetamiento que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un gen rev. El sistema de empaquetamiento puede proporcionarse en forma de una celda de empaquetamiento que contiene las secuencias de nucleótidos primera, segunda y, opcionalmente, tercera.

Los sistemas de empaquetamiento de vectores lentivirales de primera generación proporcionan construcciones de empaquetamiento separadas para gag/pol y env y, normalmente, emplean una proteína de envoltura heteróloga o funcionalmente modificada por razones de seguridad. En los sistemas de vectores lentivirales de segunda generación, se suprimen o inactivan los genes accesorios, vif, vpr, vpu y nef. Los sistemas de vectores lentivirales de tercera generación son aquellos en los cuales se ha suprimido o inactivado de otra forma (por ejemplo, por mutación) el gen tat. La compensación por la regulación de la transcripción normalmente proporcionada por tat se puede proporcionar mediante el uso de un promotor constitutivo fuerte, como el potenciador/promotor inmediato de citomegalovirus humano (HCMV-IE). Se pueden seleccionar otros promotores/potenciadores sobre la base de la fuerza de la actividad promotora constitutiva, la especificidad para el tejido diana (p. ej., promotor específico del hígado) u otros factores relacionados con el control deseado sobre la expresión, como se entiende en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede utilizar un promotor inducible como pueda ser tet para conseguir una expresión controlada. Puede proporcionarse el gen que codifica rev en una construcción de expresión separada, de modo que un sistema de vector lentiviral de tercera generación típico implicará cuatro plásmidos: uno para gagpol, rev, envoltura y el vector de transferencia. Independientemente de la generación del sistema de empaquetamiento empleado, gag y pol se pueden proporcionar en una sola construcción o en construcciones separadas.

Normalmente, se incluyen en una célula de empaquetamiento los vectores de empaquetamiento y se introducen en la célula por transfección, transducción o infección. Los métodos de transfección, transducción o infección son muy conocidos entre las personas expertas en la materia. Se puede introducir un vector retroviral de la presente invención en una línea celular de empaquetamiento, por transfección, transducción o infección, para generar una célula o línea de células productora. Los vectores de empaquetamiento pueden introducirse en células humanas o líneas celulares mediante métodos estándar que incluyen, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, lipofección o electroporación. Los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador seleccionable dominante, como neo, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de selección en presencia del fármaco apropiado y aislamiento de clones. Se puede unir físicamente un marcador seleccionable a genes codificadores mediante el vector de empaquetamiento.

Se conocen líneas celulares estables, donde las funciones de empaquetamiento están configuradas para ser expresadas por una celda de empaquetamiento adecuada. Por ejemplo, véase la patente estadounidense No. 5.686.279; y Ory et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:11400-11406, 1996, que describen células de empaquetamiento. Zufferey et al., Nature Biotechnology 15:871-875, 1997 divulgan un plásmido de empaquetamiento lentiviral donde se suprimen las secuencias 3' de pol que incluyen el gen de la envoltura del VIH-1. La construcción contiene secuencias tat y rev y el 3' LTR se reemplaza con secuencias poli A. Las secuencias 5' LTR y psi se reemplazan por otro promotor, como por ejemplo uno que sea inducible. Por ejemplo, se puede utilizar un promotor CMV.

Los vectores de empaquetamiento pueden incluir cambios adicionales a las funciones de empaquetamiento para mejorar la expresión de la proteína lentiviral y mejorar la seguridad. Por ejemplo, pueden suprimirse todas las secuencias de VIH aguas arriba de gag. Asimismo, pueden suprimirse las secuencias aguas abajo de la envoltura. Por otra parte, se pueden adoptarse etapas para modificar el vector para mejorar el empalme y la traducción del ARN.

Se puede utilizar un vector auto-inactivante (SIN), que mejora la bioseguridad del vector a través de la supresión de la repetición terminal larga (LTR) del VIH-1, tal como describe, por ejemplo, Zufferey et al., J. Virology 72 (12): 9873-9880, 1998. También se pueden utilizar vectores inducibles, como por ejemplo a través de una LTR inducible por tet.

Células hospedadoras

Las secuencias de ADN que codifican una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury se pueden expresar a partir de un vector *in vitro* por transferencia de ADN a una célula hospedadora adecuada. El término "célula hospedadora" también incluye cualquier progenie de la célula hospedadora del sujeto. Se entiende que es posible que no toda la progenie sea idéntica a la célula parental ya que puede haber mutaciones que tienen lugar durante la replicación. Los métodos de transferencia estable, lo cual significa que el ADN extraño se mantiene continuamente en el hospedador, son conocidos en la técnica.

Las células hospedadoras pueden incluir células hospedadoras de microbios, de insectos y de mamíferos. Los métodos para expresar secuencias de ADN que tienen secuencias eucariotas o virales en procariotas son muy conocidos en la técnica. Entre los ejemplos no exhaustivos de células hospedadoras adecuadas se incluyen células animales (por ejemplo, células de mamífero, como las humanas). Las técnicas para la propagación de células de mamíferos en cultivo son muy conocidas (véase, Jakobý y Pastan (eds), 1979, Cell Culture. Methods in Enzymology, volumen 58, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, NY). Entre los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero comúnmente utilizadas se incluyen las células VERO y HeLa, las células CHO y las líneas celulares WI38, BHK y COS, aunque se pueden utilizar líneas celulares, como las células diseñadas para proporcionar patrones de glicosilación deseables de expresión superior, u otras características.

La transformación de una célula hospedadora con ADN recombinante puede llevarse a cabo a través de técnicas convencionales, perfectamente conocidas entre las personas expertas en la materia. Cuando el hospedador es procariota, como por ejemplo, pero sin limitación, *E. coli*, pueden prepararse células competentes que son capaces de captar el ADN a partir de las células recogidas después de la fase de crecimiento exponencial y tratarse posteriormente a través del método CaCl_2 aplicando procedimientos perfectamente conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede utilizar mgCl_2 o RbCl . La transformación también se puede realizar después de formar un protoplasto de la célula hospedadora si se desea, o por electroporación.

Cuando el hospedador es un eucariota, pueden utilizarse métodos de transfección de ADN como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales, como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encapsulado en liposomas o infección con los vectores de poxvirus. Las células eucariotas también se pueden co-transformar con secuencias de polinucleótidos que codifican una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury, y una segunda molécula de ADN extraña que codifica un fenotipo seleccionable, como el gen de la timidina quinasa del herpes simple. Los métodos para utilizar vectores virales para transformar células eucariotas son conocidos (véase, por ejemplo, *Eukaryotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).

Un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury se expresa en la célula hospedadora, como por ejemplo una célula hospedadora de *Salmonella*, por ejemplo, una célula hospedadora de *S. typhimurium*, o una Listeria, como por ejemplo una célula hospedadora *L. monocytogenes*. Un promotor compatible con la célula hospedadora es cualquier promotor o promotor/potenciador que puede iniciar una transcripción suficiente de la proteína Brachyury o del polipéptido Brachyury, como, por ejemplo, en cantidades suficientes para inducir una respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury cuando se introduce la célula hospedadora en el sujeto. Algunos ejemplos de secuencias de control de la expresión son un promotor/potenciador del gen temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) 1 o la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV) o el promotor del virus simio 40 o el promotor tardío principal del adenovirus 2 o el promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV). Estas células hospedadoras pueden utilizarse en formas atenuadas y/o eliminadas por calor. Estas células hospedadoras pueden administrarse múltiples veces sin provocar actividad neutralizante del hospedador.

La célula hospedadora se utiliza con un adyuvante. Entre los ejemplos específicos no exhaustivos de adyuvantes útiles se incluyen GM-CSF, adyuvante Bacillus-Calmette-Guerin o ligando CD40 (CD40L).

Bacterias atenuadas: *Listeria* y *Salmonella*

Las células hospedadoras procariotas incluyen *Listeria* y *Salmonella*, que pueden utilizarse directamente para proporcionar una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury, como, por ejemplo, para su uso en los métodos divulgados en el presente documento. Por lo tanto, se puede utilizar una bacteria intracelular invasiva atenuada capaz de infectar un hospedador mamífero o una célula del mismo, pero que tiene una menor capacidad en el movimiento intra- e intercelular en el hospedador en comparación con una bacteria de tipo silvestre. Se puede transformar la bacteria con (a) un promotor activado cuando dicha bacteria está presente en el citosol de una célula hospedadora, unida operativamente a un gen estructural o fragmento del mismo, que codifica un polipéptido que es letal para la bacteria, (b) un promotor compatible con la célula hospedadora, unido operativamente a un gen estructural o fragmento del mismo, que codifica una proteína Brachyury, donde (a) y (b) pueden estar en el mismo plásmido o en plásmidos diferentes o (a) pueden integrarse en el cromosoma bacteriano. Las bacterias atenuadas

incluyen una serie de bacterias intracelulares, como *Salmonella*, *Yersinia*, *Renibacterium* y *Listeria* con capacidad de crecimiento intracelular (Coynault et al., Molecular Microbiology 22, 149-160, 1996; Hohmann et al., Vaccine 14, 19-14, 1996; Karem et al., Infection and Immunity 63, 4557-4563, 1995; O'Callaghan et al., Infection and Immunity 56, 419-423, 1988; Sigwart et al., Infection and Immunity 57, 1858-61, 1989; y Sinha et al., Infection and Immunity 65, 1566-1569, 1997).

Las bacterias invasivas atenuadas divulgadas aún pueden invadir un hospedador, o células del mismo, pero no son patógenas. La atenuación se puede lograr por mutación (véase T. Maniatis, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989). En ejemplos específicos no exhaustivos, la atenuación puede ser causada por la mutación de los genes bacterianos que codifican polipéptidos patógenos y/o tóxicos. Dicha mutación se puede conseguir de forma aleatoria, como pueda ser por modificación química, y seleccionarse más adelante, por ejemplo, por pérdida de función, o se puede dirigir al sitio. La bacteria se atenúa por supresión, inserción o mutaciones puntuales, para eliminar la función de ciertos genes que codifican polipéptidos que conducen a la patogénesis. La bacteria se atenúa por supresión de un operón completo por supresión cromosómica, como, por ejemplo, la cepa mutante atenuada de *L. monocytogenes* DELTA2 que es un derivado de la cepa de tipo silvestre completamente virulenta EGD, y carece del operón de lecitinasa completo que consiste en los genes *mpl*, *actA* y *plcB* debido a una supresión cromosómica. Debido a la supresión de este operón, se reduce significativamente la respuesta inflamatoria causada por *L. monocytogenes* durante la infección de un hospedador mamífero. Las bacterias adecuadas se divulgan, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.143.551.

Una variedad de cepas de *Salmonella* vivas posibles con diferentes niveles de atenuación, que sirven posteriormente como plataformas para el desarrollo de cepas portadoras de *Salmonella* vivas recombinantes que expresan antígenos heterólogos. Dichos portadores de vacunas de *Salmonella* vivas recombinantes están equipados con módulos que comprenden casetes de genes variables que regulan la expresión de antígenos heterólogos en *Salmonella* y determinan la presentación de los antígenos heterólogos al sistema inmunitario del hospedador. Mediante combinaciones de ambos sistemas, cepas de vacuna de *Salmonella* vivas atenuadas de manera diferente y casetes de genes variables, se puede generar una variedad de cepas de portadores vivos recombinantes que tienen una amplia aplicación.

S. typhimurium contiene dos sistemas de secreción de tipo III para determinantes de virulencia. El primero controla la invasión bacteriana de las células epiteliales y está codificado por genes dentro de una isla de patogenidad de 40 kb (SPI1). El otro está codificado por genes dentro de una segunda isla de patogenidad de 40 kb (SPI2) y es necesario para el crecimiento sistémico de dicho patógeno dentro de su hospedador. Los genes situados en la isla de patogenidad SPI1 son los principales responsables de las primeras etapas del proceso de infección, la invasión de las células hospedadoras no fagocíticas por la bacteria. Para la mayoría de los genes SPI1, las mutaciones tienen como resultado una menor capacidad de invasión *in vitro*. Sin embargo, los mutantes que son defectuosos en la invasión no son necesariamente avirulentos. En comparación, se ha demostrado a través los estudios de virulencia de mutantes SPI2 que están atenuados en al menos cinco órdenes de magnitud en comparación con la cepa de tipo silvestre tras la inoculación oral e intraperitoneal de ratones.

Muchos de los genes que codifican los componentes del sistema de secreción SPI2 están localizados en un segmento de 25 kb de SPI2. SPI2 contiene genes para un aparato de secreción de tipo III (sse) y un sistema regulador de dos componentes (ssr), así como genes candidatos para un conjunto de efectores secretados (sse) y sus chaperonas específicas (ssc). Sobre la base de similitudes con genes presentes en otros patógenos bacterianos, los primeros 13 genes dentro del operón *ssaK/U* y *ssaJ* codifican los componentes del aparato del sistema de secreción. Una serie de genes adicionales, incluyendo *ssaC*, que codifican una proteína del aparato del sistema de secreción y una proteína reguladora de dos componentes, respectivamente, se encuentran en una región de aproximadamente 8 kb desde *ssaJ*.

Por lo tanto, una célula gram-negativa atenuada puede hacer que se inactive al menos un gen seleccionado entre genes del aparato de secreción de genes efectores (sse), genes chaperon (ssc) y genes de regulación (ssr). Con respecto a los genes sse afectados por la inactivación, el gen inactivado es preferentemente *sseC*, *sseD*, *sseE* o una combinación de los mismos. En la medida en que los genes ssr estén afectados por la inactivación, preferentemente al menos *ssrB* está inactivado. En la medida en que los genes ssc estén afectados por la inactivación, preferentemente al menos *sscB* está inactivado.

La atenuación puede ser el resultado de mutaciones originales en el locus del gen SPI2. La combinación de las mutaciones individuales en el locus del gen SPI2 entre sí, así como con otras mutaciones genéticas de atenuación conocidas, como *aroA*, tiene como resultado un amplio repertorio de atenuación e inmunogenicidad. Se pueden introducir diferentes casetes de expresión en estas plataformas, lo cual permite una mayor modulación de la respuesta inmune dirigida contra los antígenos heterólogos.

La *Salmonella* o *Listeria* patógena sirve como base para la construcción de un panel de diferentes prototipos de vacunas de *Salmonella* vivas generadas por atenuaciones graduales que se llevan a cabo mediante la introducción de mutaciones definidas del locus del gen SPI2. Cada prototipo de vacuna de *Salmonella* viva individual resultante se transforma adicionalmente en una vacuna recombinante multivalente mediante la introducción de módulos de

ADN intercambiables que llevan (1) un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido Brachyury y (2) sistemas de expresión adecuados que ejecutan una presentación antigénica eficaz al hospedador inmune sistema. En conjunto, estas características provocan una respuesta inmune específica, como pueda ser una respuesta de linfocitos T específica de Brachyury.

La inactivación del gen del locus SPI2 (u homólogo funcional del mismo en células distintas de *Salmonella*) se efectúa mediante una mutación que puede comprender la supresión. La supresión es causada por inserción de un ácido nucleico heterólogo, como por ejemplo un ácido nucleico que codifica Brachyury en el gen que se va a inactivar. Con respecto a *Salmonella*, las especies patógenas de *Salmonella* se atenúan gradualmente por mutaciones en genes de virulencia individuales que forman parte del locus del gen SPI2, por ejemplo, un gen sse que codifica una proteína efectora, como sseC, sseD o sseE, o un gen ssc, como sscB, que codifica una chaperona, o un gen ssr, como ssrB, que codifica un regulador. La mutación individual de cada uno de estos genes conduce a un grado de atenuación individual única, que, a su vez, produce una respuesta inmune característica al nivel mucosal, humoral y celular. El grado de atenuación individual puede aumentarse moderadamente a través de combinaciones de al menos dos mutaciones genéticas dentro del locus del gen SPI2 o a través de la combinación con una mutación en otro gen de *Salmonella* que se sabe que atenúa la virulencia, como pueda ser un gen aro, por ejemplo aroA. Se consigue un mayor grado de atenuación mediante la mutación de un gen de virulencia que forma parte de un cúmulo de genes policistrónicos que codifica varios factores de virulencia, como la unidad transcripcional que comprende los genes sseC, sseD, sseE y sscB, de modo que la mutación ejerce un efecto polar, interrumpiendo la expresión de los siguientes genes. El grado de atenuación puede depender directamente del número de genes de virulencia afectados por la mutación polar, así como de sus características individuales. Finalmente, la atenuación más fuerte se consigue cuando están mutados los genes reguladores, como ssrB. También en este caso, cada modo de atenuación de *Salmonella* conduce a la generación de una cepa de *Salmonella* viva que evoca una respuesta inmune, véase la patente estadounidense No. 7.700.104.

Con respecto a *Listeria*, *L. monocytogenes* es una bacteria intracelular facultativa Gram-positiva que carece de lipopolisacárido (LPS) y también es capaz de invadir una gama más amplia de células de mamífero donde también se replica en el citosol (Portnoy et al., Infect. Immun. 60, 1263, 1992). Dado que invade su hospedador a través de la superficie de la mucosa intestinal, *L. monocytogenes* también es candidato para la vacunación oral. Enseguida después de la infección, las bacterias se encuentran en el bazo donde abundan los APC profesionales. Por lo tanto, la entrega de ADN a esas células se mejora significativamente mediante el uso de *L. monocytogenes* adecuadamente construido. Las células atenuadas de *L. monocytogenes* se lisan en el citosol de la célula hospedadora mediante la producción de un ADN plasmídico que libera lisina de fago dependiente de P_{actA} que lleva un gen heterólogo, como pueda ser un ácido nucleico que codifica la proteína Brachyury, bajo el control de un promotor, como pueda ser, pero sin limitación, la región promotora/potenciadora inmediata-temprana del citomegalovirus humano principal. Además de las ventajas de evitar el uso de antibióticos, la liberación de plásmidos mediada por lisina es un método eficiente comparable a la eliminación de las bacterias mediante el tratamiento con antibióticos.

La bacteria atenuada puede ser un mutante de *Listeria* de tipo silvestre que invade las células hospedadoras y se libera en el citosol de las células infectadas con eficiencias similares a la cepa de tipo silvestre, pero se ve afectada en el movimiento intra e intercelular. Por ejemplo, la cepa mutante de *L. monocytogenes* DELTA2 no puede polimerizar la actina de la célula hospedadora en el citosol que utiliza la cepa de tipo silvestre *L. monocytogenes* para su movimiento dentro de la célula hospedadora. Asimismo, debido a la supresión de *plcB*, la bacteria no puede lisar las membranas de la célula hospedadora que la lisa cepa de tipo silvestre al entrar en las células vecinas. Por lo tanto, las bacterias mutantes no pueden moverse de una célula infectada a una célula vecina (propagación de célula a célula). Esto ilustra una menor capacidad en comparación con las cepas de tipo silvestre en el movimiento intra e intercelular. La bacteria atenuada puede ser un mutante de *L. monocytogenes* que invade el hospedador y se libera en el citosol de las células infectadas con eficiencias similares a la cepa de tipo silvestre, pero no es patógena, es decir, no causa una enfermedad. En ejemplos específicos no exhaustivos, la bacteria es *L. monocytogenes* que carece del operón de lecitinas completo que contiene los genes *mpl*, *actA* y *plcB*, y codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury.

Se puede incluir también un gen estructural o fragmento del mismo, como polipéptido de codificación que es letal para la bacteria se incluye cualquier polipéptido que cuando se expresa en la bacteria tenga como resultado la liberación del ADN plasmídico y la eliminación de la bacteria, por ejemplo por lisis de la bacteria. El polipéptido puede ser una lisina de bacteriófago, preferentemente el producto génico de *ply 118* u otras lisinas codificadas por *Listeria*-fago, por ejemplo la mureinhidrolasa codificada por el gen *iap* de *L. monocytogenes* u otros genes relacionados con *iap*, especialmente *iap* de *L. grayi*. La proteína de lisis *PLY 118* es un producto génico tardío del bacteriófago *Listeria* A118 necesario para la liberación de fagos de progenie. *PLY 118* es una enzima hidrolizante de la pared celular altamente activa específica para *Listeria* (Loessner et al., Mol. Microbiol. 16, 1231, 1995). Promotor activado cuando está presente en una bacteria invasiva que está en el citosol de una célula hospedadora significa cualquier promotor que, cuando la bacteria está dentro de la célula infectada, está (bajo el control de un activador de la transcripción que está) preferentemente encendido, impulsando su transcripción. Por ejemplo, se puede utilizar el promotor de *L. monocytogenes* P_{actA} . El promotor P_{actA} está controlado por el activador de la transcripción *PrfA* que regula la mayoría de los genes de virulencia conocidos de *L. monocytogenes* y se activa específicamente en el

citosol de las células hospedadoras infectadas para interactuar con el promotor actA. Otros promotores que pueden utilizarse son otros promotores de *L. monocytogenes*, como los que controlan la expresión de inIC y otros genes para pequeñas internalinas (Engelbrecht et al., Mol. Microbiol. 21: 823-837, 1996).

5 Métodos terapéuticos y composiciones farmacéuticas

Las proteínas Brachyury y los polipéptidos Brachyury divulgados en el presente documento, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas Brachyury o los polipéptidos Brachyury o las células hospedadoras que incluyen estos ácidos nucleicos pueden utilizarse para generar una respuesta inmune en un sujeto, como pueda ser, pero sin limitación una respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury y/o una respuesta de linfocitos T CD8+ de Brachyury. En varios ejemplos, el sujeto tiene un cáncer que expresa Brachyury. En otras realizaciones, el método es un método para prevenir el cáncer en el sujeto. El sujeto puede estar en riesgo de desarrollar cáncer. En ejemplos específicos no exhaustivos, el sujeto tiene neoplasia intraepitelial prostática de alto grado, poliposis adenomatosa familiar o atipia de la mama. Dichos métodos incluyen administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más proteínas Brachyury y/o polipéptidos Brachyury, células hospedadoras, como puedan ser células hospedadoras de *Listeria* o *Salmonella*, células dendríticas que presentan epítomos de la proteína o polipéptido y/o vectores que incluyen dichos ácidos nucleicos, para generar una respuesta inmune.

Los métodos pueden incluir seleccionar un sujeto que necesita tratamiento, como pueda ser un sujeto con un cáncer que expresa Brachyury o un cáncer con el potencial de expresar Brachyury. En varios ejemplos, los métodos incluyen seleccionar un sujeto con cáncer de intestino delgado, estómago, riñón, vejiga, útero, ovarios, testículos pulmón, colon, próstata, tumor de origen de linfocitos B (como por ejemplo la leucemia linfocítica crónica (CLL), un linfoma de linfocitos B, un linfoma de Burkitt o un linfoma de Hodgkin) o cáncer de mama, donde el cáncer expresa Brachyury o tiene el potencial de expresar Brachyury. En algunos ejemplos no exhaustivos, el cáncer es resistente a la radiación y/o resistente a la quimioterapia. En otros ejemplos no exhaustivos, el sujeto tiene cáncer de mama, como un carcinoma ductal, por ejemplo, un carcinoma ductal infiltrante o un cáncer de mama receptor de estrógeno negativo y receptor de progesterona negativo. En otros ejemplos más, el sujeto tiene neoplasia intraepitelial prostática de alto grado, poliposis adenomatosa familiar o atipia de la mama.

En aplicaciones ilustrativas, las composiciones se administran a un sujeto en una cantidad suficiente para aumentar la respuesta inmune a las células que expresan Brachyury, como pueda ser una respuesta de linfocitos T CD4+. También se puede inducir una respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de Brachyury aplicando los métodos divulgados en el presente documento. La administración induce una respuesta inmune suficiente para ralentizar la proliferación de las células que expresan Brachyury, o para inhibir su crecimiento, o para reducir un signo o síntoma del cáncer, o para prevenir un cáncer. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad, el estado general de la salud del paciente y la robustez del sistema inmunitario del paciente. En un ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición es la que proporciona alivio subjetivo de uno o más síntomas o una mejora objetivamente identificable según lo observado por el profesional clínico u otro observador cualificado. La composición puede incluir una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury, un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury, un vector que incluye el ácido nucleico o una célula hospedadora que expresa la proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury. Cabe señalar que estas composiciones pueden utilizarse en combinación.

La composición puede administrarse a través de cualquier medio conocido entre las personas expertas en la materia (véase Banga, A., "Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins", en *Therapeutic Peptides and Proteins*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1995). Por lo tanto, la composición puede administrarse localmente o sistémicamente, como por ejemplo por inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa, contemplándose incluso la administración oral, nasal, transdérmica o anal. La administración puede ser por inyección subcutánea o intramuscular.

Uso de proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos y células hospedadoras

Cuando se administra la proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury, para extender el periodo que está disponible la proteína para estimular una respuesta, se puede proporcionar la proteína y/o polipéptido como un implante, una inyección oleosa, en un liposoma, o como un sistema de partículas. El sistema de partículas puede ser una micropartícula, una microcápsula, una microesfera, una nanocápsula o una partícula similar (véase, p.ej., Banga, *supra*). Se ha demostrado que un vehículo en partículas a base de polímero sintético actúa como un adyuvante para mejorar la respuesta inmune, además de proporcionar una liberación controlada. Los adyuvantes también se pueden utilizar en combinación con la proteína, incluyendo por ejemplo, quitosano, sales de aluminio, un oligodesoxinucleótido inmunoestimulador, liposomas y/o una o más citocinas. La proteína o polipéptido Brachyury se puede administrar en un liposoma.

En un ejemplo específico, no exhaustivo, se administra la proteína Brachyury de manera que se dirige la respuesta inmune a una respuesta celular (es decir, una respuesta CD4+ y/o respuesta CD8+ específica de Brachyury), en lugar de una respuesta humoral (anticuerpo). El polipéptido Brachyury puede inducir tanto una respuesta de linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury como una respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de Brachyury. Los

métodos para medir una respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ son conocidos en la técnica e incluyen ensayos biológicos, ensayos ELISPOT y separación de células activadas por fluorescencia. Un ejemplo de ensayo para medir linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury se divulga en los ejemplos a continuación.

En un ejemplo específico, no exhaustivo, una composición farmacéutica para administración intravenosa incluiría aproximadamente 0,1 µg a 10 mg de proteína Brachyury inmunogénica y/o polipéptido Brachyury por paciente al día. Se pueden utilizar dosis de 0,1 a aproximadamente 100 mg por paciente al día, particularmente si el agente se administra en un sitio aislado y no en el sistema circulatorio o linfático, como pueda ser en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano. Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para las personas expertas en la materia y se describen con más detalle en publicaciones como *Remingtons Pharmaceutical Sciences*, 19ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1995.

Opcionalmente, pueden utilizarse como adyuvantes biológicos una o más moléculas inmunoestimuladoras, como IL-2, IL-6, IL-12, LFA (por ejemplo, LFA-1, LFA-2 y/o LFA-3), CD72, RANTES, G-CSF, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, ICAM-1, B7-1, B7-2, otras moléculas relacionadas con B7, OX-40L y/o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas (véase, por ejemplo, Salgaller et al., 1998, *J. Surg. Oncol.* 68 (2): 122-38; Lotze et al., 2000, *Cancer J Sci. Am.* 6 (Suppl 1): S61-6; Cao et al., 1998, *Stem Cells* 16 (Supl. 1): 251-60; Kuiper et al., 2000, *Adv. Exp. Med. Biol.* 465: 381-90). Estas moléculas pueden administrarse sistémicamente (o localmente) al hospedador. En varios ejemplos, se administran IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, B7-1 B7-2, OX-40L, 41 BBL y/o ICAM-1. Se puede administrar IL-15 o un complejo receptor de IL-15/IL-15.

Se conocen varios medios para inducir respuestas celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han identificado los lípidos como agentes capaces de favorecer la sensibilización de linfocitos T *in vivo* contra diversos antígenos. Por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense No. 5.662.907, los restos de ácido palmítico pueden unirse a los grupos amino alfa y epsilon de un resto de lisina y luego unirse (por ejemplo, a través de uno o más restos de enlace, como glicina, glicina-glicina, serina, serina-serina o similares) a un péptido o proteína inmunogénica. El péptido lipidado puede inyectarse después directamente en forma micelar, incorporarse en un liposoma o emulsionarse en un adyuvante. Según otro ejemplo, pueden utilizarse las lipoproteínas de *E. coli*, como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina para sensibilizar linfocitos T específicos de tumor cuando se unen covalentemente a un péptido o una proteína apropiada (véase, Deres et al., *Nature* 342:561, 1989). Asimismo, como la inducción de anticuerpos neutralizantes también se puede sensibilizar con la misma molécula conjugada con una proteína que despliega un epítipo apropiado, se pueden combinar dos composiciones para provocar respuestas humorales y mediadas por células donde se considere deseable.

Se proporciona así una composición farmacéutica que incluye una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury. Estas composiciones se utilizan para generar una respuesta inmune, como por ejemplo para inmunoterapia.

En una realización, la proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury se mezclan con un adyuvante que contiene dos o más entre un detergente estabilizador, un agente formador de micelas y un aceite. Los detergentes estabilizantes, los agentes formadores de micelas y los aceites adecuados se detallan en la patente estadounidense No. 5.585.103; patente estadounidense No. 5.709.860; patente estadounidense No. 5.270.202; y la patente estadounidense No. 5.695.770. Un detergente estabilizador es cualquier detergente que permita que los componentes de la emulsión permanezcan como una emulsión estable. Entre dichos detergentes se incluyen polisorbato, 80 (TWEEN) (Sorbitan-mono-9-octadecenoato-poli(oxi-1,2-etanodiilo; fabricado por ICI Americas, Wilmington, DE), TWEEN 40™, TWEEN 20™, TWEEN 60, Zwittergent™ 3-12, TEEPOL HB7™ y SPAN 85™. Estos detergentes generalmente se proporcionan en una cantidad de aproximadamente 0,05 a 0,5 %, como por ejemplo aproximadamente 0,2 %. Un agente formador de micelas es un agente que es capaz de estabilizar la emulsión formada con los otros componentes de manera que se forme una estructura de tipo micela. Dichos agentes generalmente causan cierta irritación en el sitio de inyección para reclutar macrófagos para mejorar la respuesta celular. Entre los ejemplos de dichos agentes se incluyen tensioactivos poliméricos descritos por las publicaciones de BASF Wyandotte, por ejemplo, Schmolka, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 54: 110, 1977, y Hunter et al., *J. Immunol* 129: 1244, 1981, PLURONIC™ L62LF, L101 y L64, PEG1000 y TETRONIC™ 1501, 150R1, 701, 901, 1301 y 130R1. Las estructuras químicas de dichos agentes se conocen perfectamente en la técnica. Se puede seleccionar el agente para que tenga un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) entre 0 y 2, según lo definido por Hunter y Bennett, *J. Immun.* 133: 3167, 1984. Se puede proporcionar el agente en una cantidad eficaz, por ejemplo entre 0,5 y 10 % o en una cantidad entre 1,25 y 5 %.

El aceite incluido en la composición se selecciona para promover la retención del antígeno en la emulsión de aceite en agua, de tal modo que se proporcione un vehículo para el antígeno deseado, y preferentemente tiene una temperatura de fusión de menos de 65 °C de modo que se forme esa emulsión ya sea a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C a 25 °C), o una vez que la temperatura de la emulsión se reduce a temperatura ambiente. Entre los ejemplos de dichos aceites incluyen escualeno, escualano, EICOSANE™, tetratetracontano, glicerol y aceite de cacahuete u otros aceites vegetales. En un ejemplo específico, no exhaustivo, el aceite se proporciona en una cantidad entre 1 y 10 %, o entre 2,5 y 5 %. El aceite debe ser tanto biodegradable como

biocompatible para que el cuerpo pueda descomponer el aceite con el tiempo y para que no se perciban efectos adversos, como los granulomas, con el uso del aceite.

El adyuvante puede ser una mezcla de detergentes estabilizantes, agente formador de micelas y aceite disponible con el nombre PROVAX® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA). La proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury pueden incluirse en un liposoma.

También se pueden administrar con la proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury adyuvantes. Un adyuvante puede ser cualquier molécula inmunoestimuladora, como una citocina, un ácido nucleico inmunoestimulador o un adyuvante biológico (véase lo anterior). El adyuvante puede ser quitosano. El quitosano es un polisacárido lineal formado a partir de unidades de repetición (unidas en 1-4) de beta N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, y se deriva de la desacetilación parcial de quitina obtenida de las conchas de los crustáceos. El quitosano se puede preparar comercialmente por hidrólisis alcalina heterogénea de quitina para dar un producto que posee una distribución aleatoria de restos acetilos restantes. Las propiedades de los quitosanos dependen, entre otras cosas, del grado de desacetilación y del peso molecular. La mayoría de los quitosanos disponibles en el mercado contienen una población de moléculas de quitosano de diversos pesos moleculares y diversas concentraciones de los grupos componentes N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. Se sabe que las propiedades inmunológicas de los quitosanos están ligadas a la relación entre los grupos N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. La eficacia de los quitosanos como adyuvantes depende en gran medida del nivel de desacetilación. Por lo tanto, el quitosano está al menos 80 % desacetilado, véase la patente estadounidense No. 6.534.065.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada se pueden preparar como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas de partículas. Para una visión general de los sistemas de entrega de proteínas, véase Banga, *Therapeutic Peptides and Proteins; Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, 1995. Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico está dispersado por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas por debajo de aproximadamente 1 µm generalmente se denominan nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, de modo que solo se administran nanopartículas por vía intravenosa. Las micropartículas son normalmente de alrededor de 100 µm de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular (véase Kreuter, *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, pp. 219-342, 1994; Tice & Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery* A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, pp. 315-339, 1992).

Los polímeros se pueden utilizar para la liberación controlada por iones. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en la administración controlada de fármacos (Langer, *Accounts Chem. Res.* 26: 537, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, polaxamero 407, existe como un líquido viscoso pero móvil a bajas temperaturas, pero que forma un gel semisólido a temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y el suministro sostenido de interleucina-2 y ureasa recombinantes (Johnston et al., *Pharm. Res.* 9: 425, 1992; y Pec, J. *Parent. Sci. Tech.* 44 (2):58, 1990). Alternativamente, se ha utilizado hidroxiapatita como un microportador para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., *Int. J. Pharm.* 112: 215, 1994). En otro aspecto más, se utilizan los liposomas para la liberación controlada, así como para dirigir el fármaco del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri et al., *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1993). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la entrega controlada de proteínas terapéuticas (p.ej., patente estadounidense No. 5.055.303; patente estadounidense No. 5.188.837; patente estadounidense No. 4.235.871; patente estadounidense No. 4.501.728; patente estadounidense No. 4.837.028; patente estadounidense No. 4.957.735; y patente estadounidense No. 5.019.369; patente estadounidense No. 5.055.303; patente estadounidense No. 5.514.670; patente estadounidense No. 5.413.797; patente estadounidense No. 5.268.164; patente estadounidense No. 5.004.697; patente estadounidense No. 4.902.505; patente estadounidense No. 5.506.206 ; patente estadounidense No. 5.271.961; patente estadounidense No. 5.254.342; y patente estadounidense No. 5.534.496).

Se divulga en el presente documento una composición que incluye un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury. Se puede administrar a un sujeto cantidad terapéuticamente eficaz del polinucleótido que codifica la proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury para generar una respuesta inmune. En un ejemplo específico, no exhaustivo, se administra a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polinucleótido que codifica la proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury para tratar o prevenir el cáncer.

Opcionalmente, se pueden utilizar como adyuvantes biológicos una o más moléculas inmunoestimuladoras y/o moléculas coestimuladoras, como IL-2, IL-6, IL-12, LFA (por ejemplo, LFA-1, LFA-2 y/o LFA-3), CD72, RANTES, G-CSF, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, ICAM-1, B7-1, B7-2, otras moléculas relacionadas con B7, OX-40L o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas, (véase, por ejemplo, Salgaller et al., 1998, *J. Surg. Oncol.* 68 (2): 122-38; Lotze et al., 2000, *Cancer J Sci. Am.* 6 (Supl.): S61 -6; Cao et al., 1998, *Stem Cells* 16 (Supl. 1): 251-60; Kuiper et al, 2000, *Adv. Exp. Medicina. Biol.* 465: 381-90). Estas moléculas pueden administrarse sistémicamente (o localmente) al hospedador. En varios ejemplos, se administran IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, B7-1 B7-2, OX-40L, 41 BBL y/o ICAM-1. Se puede administrar IL-15 o un complejo receptor de IL-15/IL-15.

Opcionalmente, se administra un vector no de levadura no de pox que codifica una o más moléculas inmunoestimuladoras o coestimuladoras, como IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, LFA (por ejemplo, LFA-1, LFA-2 y/o LFA-3), CD72, RANTES, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , ICAM-1, B7-1, B7-2, otras moléculas relacionadas con B7, OX-40L o 41 BBL, o combinaciones de estas moléculas (véase, por ejemplo, Salgaller et al., 1998, J. Surg. Oncol. 68 (2): 122-38; Lotze et al., 2000, Cancer J Sci. Am. 6 (Suppl I): S61-6; Cao et al., 1998, Stem Cells 16 (Suppl 1): 251-60; Kuiper et al., 2000, Adv. Exp. Med. Biol. 465: 381-90). En varios ejemplos, el vector puede codificar IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, B7-1 B7-2, OX-40L, 41 BBL y/o ICAM-1. El ácido nucleico que codifica el adyuvante biológico puede clonarse en el mismo vector que la proteína Brachyury o la secuencia de codificación del polipéptido Brachyury, o el ácido nucleico puede clonarse en uno o más vectores separados para co-administración. Por otra parte, pueden co-administrarse factores inmunomoduladores inespecíficos como Bacillus Calmette-Guérin (BCG) y levamisol.

Un enfoque para la administración de ácidos nucleicos es la inmunización directa con ADN de plásmido, como por ejemplo con un plásmido de expresión de mamífero. Tal como se ha descrito, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o polipéptido Brachyury puede colocarse bajo el control de un promotor para aumentar la expresión de la molécula.

La inmunización mediante construcciones de ácido nucleico es muy conocida en la técnica y se da a conocer por ejemplo en la patente estadounidense No. 5.643.578 (que describe métodos para inmunizar vertebrados mediante la introducción de ADN que codifica un antígeno deseado para provocar una respuesta mediada por células o humoral) y la patente estadounidense No. 5.593.972 y la patente estadounidense No. 5.817.637 (que describen la unión operativa de una secuencia de ácidos nucleicos que codifican un antígeno a secuencias reguladoras que permiten la expresión). La patente estadounidense No. 5.880.103 describe varios métodos de entrega de ácidos nucleicos que codifican péptidos inmunogénicos u otros antígenos a un organismo. Los métodos incluyen la entrega liposómica de los ácidos nucleicos (o de los propios péptidos sintéticos) y construcciones inmunoestimuladoras, o ISCOMS™, estructuras de tipo jaula cargadas negativamente de 30-40 nm de tamaño formadas espontáneamente al mezclar colesterol y Quil A™ (saponina). Se ha generado inmunidad protectora en diversos modelos experimentales de infección, incluyendo toxoplasmosis y tumores inducidos por el virus de Epstein-Barr, utilizando ISCOMS™ como vehículo de entrega de antígenos (Mowat y Donachie, *Immunol. Today* 12: 383, 1991). Se ha observado que dosis de antígeno tan bajas como 1 μ g encapsuladas en ISCOMS™ producen respuestas CTL mediadas por Clase I (Takahashi et al., *Nature* 344: 873, 1990). En otras realizaciones, el ácido nucleico puede cargarse en microesferas de oro a través de métodos convencionales e introducirse en la piel mediante un dispositivo como la pistola de genes HELIOS™ de Bio-Rad. Los ácidos nucleicos pueden estar "desnudos", que consisten en plásmidos bajo el control de un promotor fuerte. Normalmente, se inyecta el ADN en el músculo, aunque también se puede inyectar directamente en otros sitios, incluyendo los tejidos en proximidad a las metástasis. Las dosis para inyección son generalmente de aproximadamente 0,5 μ g/kg a aproximadamente 50 mg/kg, y normalmente son de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.589.466).

En otro enfoque para utilizar ácidos nucleicos para la inmunización, puede expresarse también una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury mediante células hospedadoras atenuadas o vectores virales no de levadura no de pox. Estos vectores y células hospedadoras se han divulgado anteriormente. Los vectores virales no de levadura y no de pox adecuados incluyen un adenovirus, un alfavirus, un lentivirus, un virus del sarampión o un vector de poliovirus. La célula hospedadora adecuada incluye una bacteria atenuada, como por ejemplo células hospedadoras de *Listeria* o *Salmonella*.

Puede utilizarse un primer virus no de pox recombinante que codifica una proteína Brachyury junto con un segundo virus no de pox recombinante que ha incorporado en un genoma viral o una porción infectable del mismo uno o más genes o secuencias de ADN que codifican B7-1, B7-2, o B7-1 y B7-2, donde la composición es capaz de co-infectar una célula hospedadora que da como resultado la co-expresión del polipéptido y los genes que codifican B7-1, B7-2 o B7-1 y B7-2 o secuencias de ADN (véanse la patente estadounidense No. 6.893.869 y la patente estadounidense No. 6.045.908). Se ha demostrado que la expresión de la familia de genes B7 es un mecanismo importante de respuestas antitumorales tanto en ratones como en seres humanos.

Cuando se utiliza un vector viral no de pox, es deseable proporcionar al receptor una dosis de cada virus recombinante en la composición en el intervalo de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de placa/mg de mamífero, aunque se puede administrar una dosis menor o mayor. La composición de los vectores virales recombinantes puede introducirse en un mamífero antes de cualquier evidencia de cáncer o para intervenir en la regresión de la enfermedad en un mamífero afectado por el cáncer. Entre los ejemplos de métodos para administrar la composición en mamíferos se incluyen, pero sin limitación, exposición de células al virus recombinante *ex vivo*, o inyección de la composición en el tejido afectado o administración intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular del virus. Alternativamente, el vector viral recombinante o la combinación de vectores virales recombinantes pueden administrarse localmente por inyección directa en la lesión cancerosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, la cantidad de vector viral recombinante no de pox, que lleva la secuencia de ácidos nucleicos de una proteína Brachyury o polipéptido Brachyury para su administración se basa en el título de

partículas de virus. Un ejemplo de intervalo del inmunógeno que se administre es de 10^5 a 10^{10} partículas de virus por mamífero, como pueda ser un ser humano.

5 Cuando se utiliza una combinación de un primer vector viral recombinante que lleva una secuencia de ácido nucleico de una proteína Brachyury o polipéptido Brachyury y un segundo vector viral recombinante que lleva la secuencia de ácido nucleico de una o más moléculas coestimuladoras o inmunoestimuladoras, se puede inmunizar al mamífero con diferentes relaciones del primer y segundo vector viral recombinante. La relación entre el primer vector y el segundo vector es aproximadamente 1:1 o aproximadamente 1:3 o aproximadamente 1:5. Las relaciones óptimas entre el primer vector y el segundo vector pueden titularse fácilmente aplicando los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.893.869). La producción simultánea de una molécula inmunoestimuladora y la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury aumenta la generación de efectores específicos. Sin vincularse a teoría alguna, dependiendo de las moléculas inmunoestimuladoras específicas, diferentes mecanismos podrían ser responsables de la inmunogenicidad mejorada: el aumento de la señal de ayuda (IL-2), el reclutamiento de APC profesional (GM-CSF), el aumento de la frecuencia de CTL (IL-2), el efecto sobre la ruta de procesamiento de antígeno y la expresión de MHC (IFN γ y TNF α) y similares. Por ejemplo, se pueden administrar IL-2, IL-6, IL-15, interferón, factor de necrosis tumoral o un ácido nucleico que codifica estas moléculas, en combinación con una proteína Brachyury, o un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury. La co-expresión de una proteína Brachyury o un polipéptido Brachyury junto con al menos una molécula inmunoestimuladora puede ser eficaz en un modelo animal para mostrar efectos anti-tumor.

20 Se administran dosis únicas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y la frecuencia según lo requiere y tolere el sujeto. La dosis se puede administrar una vez como un bolo, pero en otra realización se puede aplicar periódicamente hasta que se consiga un resultado terapéutico. Generalmente, la dosis es suficiente para inducir una respuesta inmune a Brachyury, para tratar o mejorar los síntomas o signos de enfermedad, sin producir una toxicidad inaceptable al sujeto. Se puede utilizar la administración sistémica o local.

Uso de células presentadoras de antígeno

30 En otro método, se pulsan o se incuban células presentadoras de antígeno (APC), como por ejemplo células dendríticas, conjuntamente con una proteína Brachyury y/o un polipéptido Brachyury *in vitro*. En un ejemplo específico, no exhaustivo, las células presentadoras de antígeno pueden ser células autólogas. Pueden administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de las células presentadoras de antígeno, como puedan ser células dendríticas que presentan epítomos de la proteína o polipéptido, a un sujeto. Se divulga además en el presente documento un para tratar y/o prevenir el cáncer en un sujeto.

35 La proteína Brachyury y/o el polipéptido Brachyury puede administrarse a las células dendríticas o a los precursores de las células dendríticas a través de cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, células dendríticas pulsantes directamente con antígeno, o utilizando una amplia variedad de vehículos de entrega de antígeno, como, por ejemplo, liposomas u otros vectores conocidos por suministrar antígeno a las células. En un ejemplo específico, no exhaustivo, una formulación antigénica incluye de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 1,000 μ g, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 μ g de una proteína Brachyury seleccionada. La proteína Brachyury también se puede administrar con agentes que promueven la maduración de células dendríticas. Entre los ejemplos específicos y no exhaustivos de agentes útiles se incluyen interleucina-4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), o ligando flt-3 (flt-3L). La preparación también puede contener tampones, excipientes y conservantes, entre otros ingredientes.

45 Las células presentadoras de antígeno maduras se pueden generar para presentar los epítomos de la proteína Brachyury y/o del polipéptido Brachyury. Estas células dendríticas se administran solas (o en combinación con otro agente) a un sujeto con un cáncer que expresa Brachyury, o que tiene el potencial para expresar Brachyury, como por ejemplo cáncer de intestino delgado, estómago, riñón, vejiga, útero, ovario, testículo, colon de pulmón, cáncer de próstata, un tumor de origen de linfocitos B (como leucemia linfocítica crónica (CLL), un linfoma de células B, linfoma de Burkitt o un linfoma de Hodgkin) o cáncer de mama, como un carcinoma ductal infiltrante o un receptor de estrógeno negativo y cáncer de mama receptor negativo de progesterona. En algunos ejemplos, el cáncer es resistente a la radiación y/o resistente a la quimioterapia. Las células presentadoras de antígeno también se pueden administrar para prevenir estos cánceres. El sujeto puede tener neoplasia intraepitelial prostática de alto grado, poliposis adenomatosa familiar o atipia de la mama.

60 Las células pueden administrarse a un sujeto para inhibir el crecimiento de células de Brachyury que expresa cáncer o un cáncer que tiene el potencial para expresar Brachyury. En estas aplicaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de células presentadoras de antígeno activadas a un sujeto que padece una enfermedad, en una cantidad suficiente para aumentar la respuesta inmune a las células que expresan Brachyury. La respuesta inmune resultante es suficiente para retrasar la proliferación de dichas células o para inhibir su crecimiento, o para reducir un signo o un síntoma del tumor.

En un método suplementario, se aumenta cualquiera de estas inmunoterapias mediante la administración de una citocina, como la interleucina (IL)-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, GM-LCR o interferones. Se administran las células dendríticas maduras junto con un agente quimioterapéutico.

5 *Terapia combinada*

Es posible administrar al sujeto una proteína Brachyury, un polipéptido Brachyury, un ácido nucleico que codifica una proteína Brachyury, una célula hospedadora que expresa la proteína Brachyury y/o las células dendríticas, y se le administra un agente adicional. En un ejemplo, esta administración es secuencial. Sin embargo, la administración puede ser simultánea.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer. El cáncer puede expresar Brachyury o tener el potencial para expresar Brachyury. Por lo tanto, el agente adicional puede ser un agente quimioterapéutico. Entre los agentes adicionales se incluyen la radiación de moléculas pequeñas dirigidas a anticuerpos terapéuticos y monoclonales. Se puede administrar al sujeto un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epitelial, un inhibidor del factor de crecimiento transformante (TGF)- β o un inhibidor de la tirosina cinasa.

El agente quimioterapéutico adicional puede ser un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR). Se conocen numerosos compuestos que inhiben el EGFR, véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.196.446; patente estadounidense No. 5.217.999; patente estadounidense No. 5.459.061; patente estadounidense No. 7.049.410; patente estadounidense No. 6.355.678. Hay varios inhibidores de EGFR en desarrollo clínico, como, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer de pulmón. Entre ellos se incluyen tustuzumab, lapatinib, pertuzumab, panitumumab, gefitinib (IRESSA®), erlotinib (TARCEVA®), cetuximab (ERTIBUX®), afatinib, nectinmab, nimotuzumab, PF299804 (Pfizer), RO5083945 (Roche), ABT-806 (Abbott) y AP2113 (Arbiad). El agente quimioterapéutico adicional puede ser un inhibidor de tirosina quinasa. Entre ellos incluyen, pero sin limitación, avastina y temsirolimus.

Entre los ejemplos de agentes adicionales útiles se incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales u hormonas y sus antagonistas. Entre los ejemplos de agentes alquilantes se incluyen mostazas nitrogenadas (como mecloretamina, ciclofosfamida, melfalan, mostaza de uracilo o clorambucilo), sulfonatos de alquilo (como busulfano), nitrosoureas (como carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina o dacarbazina). Entre los ejemplos de antimetabolitos se incluyen análogos de ácido fólico (como metotrexato), análogos de pirimidina (como 5-FU o citarabina) y análogos de purina, como mercaptopurina o tioguanina. Entre los ejemplos de productos naturales se incluyen alcaloides de la vinca (como vinblastina, vincristina o vindesina), epipodofilotoxinas (como etopósido o tenipósido), antibióticos (como dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina o mitomicina C) y enzimas (como L-asparaginasa). Entre los ejemplos de agentes diversos se incluyen complejos de coordinación de platino (como cis-diamina-dicloroplatino II también conocido como cisplatino), ureas sustituidas (como hidroxurea), derivados de metilhidrazina (como procarbazona) y supresores adrenocróticos (como mitotano y aminoglutetimida). Entre los ejemplos de hormonas y antagonistas se incluyen adrenocorticosteroides (como prednisona), progestinas (como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol), estrógenos (como dietilestilbestrol y etinilestradiol), antiestrógenos (como tamoxifeno) y andrógenos (como propionato de testosterona y fluoximesterona). Entre los ejemplos de los medicamentos de quimioterapia más utilizados que pueden administrarse simultáneamente con la inmunoterapia divulgada se incluyen adriamicina, Alkeran, Ara-C, BiCNU, Busulfan, CCNU, Carboplatino, Cisplatino, Citoxano, Daunorrubicina, DTIC, 5-FU, Fludarabine, Hydrea, Idarubicina, Ifosfamida, Metotrexato, Mitramicina, Mitomicina, Mitoxantrona, Mostaza nitrogenada, Taxol (u otros taxanos, como docetaxel), Velban, Vincristina, VP-16, mientras que algunos medicamentos más nuevos incluyen Gemcitabina (Gemzar), Herceptina, Irinotecan (Campotosar, CPT-11), Leustatina, Navelbine, Rituxan STI-571, Taxotere, Topotecan (Hicantina), Xeloda (Capecitabina), Zavelin y calcitriol. Entre los ejemplos no exhaustivos de inmunomoduladores que pueden utilizarse se incluyen AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; Genéticos Institute), IL-2 (Cetus o Hoffman-LaRoche), inmunoglobulina humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg of New Orleans, La.), SK&F 106528 y TNF (factor de necrosis tumoral; Genentech).

El agente adicional puede ser una molécula pequeña, una vacuna o un producto biológico. Por ejemplo, cuando el agente adicional es una vacuna, la vacuna puede ser una vacuna a base de levadura o viral (por ejemplo, a base de poxviral). Entre los ejemplos de vectores virales se incluyen poxvirus, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus herpes, virus de la polio, alfavirus, baculovirus y virus Sindbis. El vector viral puede ser un poxvirus seleccionado del grupo que consiste en ortopox, avipox, viruela aviar, viruela de mapache, viruela de conejo, capripox (p. ej., viruela ovina), leporipox y suipox (p. ej., viruela porcina). Los ejemplos de virus avipox incluyen viruela aviar, viruela paloma y viruela canaria, como ALVAC. Entre los ejemplos de virus de la ortopox se incluyen vaccinia, vaccinia modificada Ankara (MVA), Wyeth, NYVAC, TROYVAC, Dry-Vax, POXVAC-TC (Schering-Plough Corporation) y sus derivados. Por ejemplo, entre los derivados de la cepa Wyeth se incluyen, pero sin limitación, derivados que carecen de un gen K1L funcional.

La vacuna puede codificar cualquier antígeno adecuado, como pueda ser la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury descrito en el presente documento, 5-a-reductasa, α -fetoproteína ("AFP"), AM-1, APC, abril, gen de

antígeno de melanoma B ("BAGE"), β -catenina, Bel 2, bcr-abl, Brachyury, CA-125, caspasa-8 ("CASP-8", también conocido como "FLICE"), catepsinas, CD19, CD20, CD21/receptor 2 del complemento ("CR2"), CD22/BL-CAM, CD23/Fc ϵ R1I, CD33, CD35/receptor 1 del complemento ("CR1"), CD44/PGP-1, CD45/antígeno común de leucocitos ("LCA"), CD46/proteína cofactor de membrana ("MCP"), CD52/CAMPATH-1, CD55/factor de aceleración de la descomposición ("DAF"), CD59/protectina, CDC27, CDK4, antígeno carcinoembrionario ("CEA"), c-myc, ciclooxigenasa-2 ("cox-2"), suprimido en el gen del cáncer colorrectal ("DCC"), DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, farnesil transferasa, factor de crecimiento de fibroblastos-8a ("FGF8a"), factor de crecimiento de fibroblastos-8b ("FGF8b"), FLK-1/KDR, receptor de ácido fólico, G250, familia de genes de antígeno de melanoma G ("familia GAGE"), gastrina 17, hormona liberadora de gastrina, gangliósido 2 ("GD2")/gangliósido 3 ("GD3")/ácido gangliósido-monosialico-2 ("GM2"), hormona liberadora de gonadotropina ("GnRH"), UDP-GlcNAc: R₁Man (α 1-6) R₂ [GlcNAc a Man (α 1-6)] β 1-6-N-acetilglucosaminiltransferasa V ("GnT V"), GP1, gp 100/Pme117, gp-100-in4, gp 15, gp75/proteína relacionada con la tirosina-1 ("gp75/TRP-I"), gonadotropina coriónica humana ("hCG"), heparanasa, Her2/neu, virus de tumor mamario humano ("HMTV"), proteína de choque térmico de 70 kiloDalton ("HSP70"), transcriptasa inversa de telomerasa humana ("hTERT"), receptor de factor de crecimiento de tipo insulina-1 ("IGFR-1"), receptor de interleucina-13 ("IL-13R"), óxido nítrico sintasa inducible ("iNOS"), Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, familia codificadora de antígeno de melanoma ("familia MAGE", que incluye al menos MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 y MAGE-4), mammaglobina, MAP17, Melan-A/antígeno melanoma reconocido por los linfocitos T-1 ("MART-1"), mesotelina, MIC A/B, MT-MMP, mucina, antígeno específico de testículos NY-ESO-1, osteonectina, p15, P170/MDR1, p53, p97/melanotransferrina, PAI-1, factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGF"), μ PA, PRAME, probasin, progenipoietina, antígeno prostático específico ("PSA"), antígeno prostático específico de membrana ("PSMA"), RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, familia SSX, STAT3, STn, TAG-72, factor de crecimiento transformante alfa ("TGF- α "), factor de crecimiento transformante-beta ("TGF- β "), timosina-beta-15, factor de necrosis tumoral alfa ("TNF- α "), TP1, TRP-2, tirosinasa, factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"), ZAG, p16INK4 y/o glutatión-S-transferasa ("GST").

La vacuna es PROSTVAC™, que es una combinación dosificada secuencialmente de dos poxvirus diferentes, cada uno de los cuales codifica el antígeno específico de próstata (PSA) más tres moléculas coestimuladoras inmunoestimuladoras B7.1, ICAM-1 y LFA -3 (TRICOM). El primer poxvirus es Vaccinia-PSA-TRICOM, y el segundo poxvirus es Fowlpox-PSA-TRICOM.

Por lo tanto, en el presente documento se divulga un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una terapia de combinación que comprende:

(1) (a) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos al menos idéntica en un 90 % a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (b) un polipéptido que comprende al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; (c) un ácido nucleico que codifica la proteína o el polipéptido; (d) una célula hospedadora que expresa la proteína o el polipéptido; o (e) un vector no de levadura no de pox que codifica la proteína o el polipéptido, y

(2) una molécula pequeña, una vacuna (por ejemplo, una vacuna no de levadura o no de pox tal como se ha descrito) o un producto biológico, tratando o previniendo así el cáncer en el sujeto.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Inducción de células CD4+ con el uso de la proteína Brachyury o el polipéptido Brachyury

Las Figuras 1 y 2 muestran la inducción de células CD4+ con el uso de la proteína Brachyury y un polipéptido Brachyury.

I. Figura 1

Métodos: Se prepararon células dendríticas (DC) de 2 donantes normales a partir de la fracción de células adherentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por cultivo en presencia de GM-CSF e IL-4. El día 5, se añadió una proteína Brachyury de longitud completa recombinante purificada a los cultivos (10 μ g/ml) durante 48 horas. Para el donante 2, se estableció un cultivo adicional usando proteína de control de HSA purificada (albúmina de suero humano) (10 μ g/ml). El día 7, se recogieron DC pulsadas con proteína, se irradiaron (20 Gy) y se utilizaron como células presentadoras de antígeno (APC) para estimular PBMC autólogas (relación DC: PBMC igual a 1:10). En los días 3 y 5, se añadió 1L-2 (20 U/ml) a los cultivos. Se recogieron las células el día 7 y los linfocitos T CD4+ se aislaron por selección negativa utilizando perlas magnéticas de purificación de CD4 (Miltenyi Biotec). Los linfocitos T CD4+ se estimularon posteriormente de manera similar durante un ciclo adicional de 7 días. En el día 7, se purificaron nuevamente los linfocitos T CD4+ utilizando perlas magnéticas de purificación CD4 y se evaluó la producción de IFN-gamma como respuesta a radiación autóloga, se irradiaron PBMC (proporción PBMC: linfocitos T CD4+ igual a 3: 1) solas o pulsadas con proteína HSA de control frente a proteína Brachyury (10 μ g/ml). Se recogieron los sobrenadantes de cultivo al cabo de 96 horas y se evaluó la IFN-gamma por ELISA.

Resumen de los hallazgos: Tal como se muestra en la Figura 1, los linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury pueden expandirse de la sangre de donantes normales mediante cultivo de PBMC en presencia de DC autólogas pulsadas con una proteína Brachyury purificada de longitud completa. Al cabo de 2 rondas de estimulación *in vitro*, los linfocitos T CD4+ específicos de Brachyury liberaron específicamente IFN-gamma como respuesta a la estimulación con PBMC autólogas pulsadas con proteína Brachyury purificada (de longitud completa, recombinante) pero no con una proteína de control irrelevante (HAS).

II. Figura 2

Métodos: se generó una línea de linfocitos T específicos para Brachyury CD4+ (T-BRA) de un paciente de próstata vacunado con una vacuna basada en PSA. Se utilizaron las DC autólogas maduras con CD40L como células presentadoras de antígeno (APC). Las PBMC obtenidas el día 90 después de la vacunación se agregaron a las APC y se pulsaron con 10 µg/ml de péptido agonista Brachyury de 9-meros (WLLPGTSTV) en una relación efector: APC de 10:1. A continuación, se incubó el cultivo durante 3 días a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5 % de CO₂. A continuación se suplementó el cultivo con IL-7 e IL-15 humana recombinante a una concentración de 10 ng/ml durante 5 días. La incubación de 3 días con péptido y 5 días del suplemento de IL-7 e IL-15 constituyó un ciclo de estimulación *in vitro* (IVS). Las DC autólogas se utilizaron como APC durante 3 ciclos de estimulación *in vitro* (IVS). Los linfocitos B autólogos transformados con EBV irradiados (23.000 rads) se utilizaron como APC después del tercer ciclo IVS. Para la reestimulación con linfocitos B transformados con EBV, se utilizaron péptidos a una concentración de 10 µg/ml para impulsar los linfocitos B autólogos transformados con EBV en una relación efector: APC de 1:3. Los linfocitos T CD4+ se aislaron después del cultivo celular al final del 4º IVS y se estimularon con un péptido Brachyury clase II de 15-meros (Brachyury clase IIBXQWGWLLPGTSTL). Los cultivos se complementaron con IL-7 e IL-15 humana recombinante a una concentración de 10 ng/ml durante 5 días. A continuación, se sometió a ensayo la línea de linfocitos T CD4+ para determinar la especificidad del epítipo de Brachyury clase IIB mediante estimulación con APC pulsadas con el Brachyury clase IIB o un epítipo control de Brachyury clase IIA.

Ejemplo 2: Brachyury en carcinoma

Las Figs. 3-7 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 1. Expresión de Brachyury en tejidos primarios de carcinoma de mama por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-Brachyury murino monoclonal

No. Pt	Tumor		Tejido adyacente	Tejido distal
	% Positividad	Intensidad		
1	80	++	pos	neg
2	80	++	pos	neg
3	90	++	pos	neg
4	90	+	neg	neg
5	90	+	pos	neg
6	30	+	neg	neg
7	15	+++	neg	neg
8	60	+	neg	neg
9	focal	+	neg	neg
10	70	+	neg	neg
11	40	+	neg	neg
12	30	+	neg	neg
13	focal	+	neg	neg
14	90	+++	neg	neg
15	90	-/+	pos	neg
16	30	+	neg	neg
17	neg	neg	neg	neg
18	50	++	neg	neg
19	neg	neg	neg	neg
20	neg	neg	neg	neg
21	40	++	pos	neg
22	30	++	pos	neg
23	85	++	pos	neg
24	80	+++	pos	neg
25	30	+	pos	neg
26	50	++	pos	neg
27	65	++	pos	NA
28	40	+++	pos	neg
29	25	++	pos	NA
30	15	+	pos	NA

Pos = positivo; neg = negativo; NA = no disponible

Tabla 2. Expresión de Brachyury en tejidos de carcinoma primario de mama por inmunohistoquímica según estado de ganglios linfáticos, grado tumoral y expresión del receptor de hormona

Muestra de tejido de tumor	Número de tumores positivos para Brachyury
<i>Estado de ganglio linfático</i>	
Ganglio-negativo	13/15 (86,7 %)
Ganglio-positivo	10/11 (93,3 %)
<i>Grado</i>	
G1	2/3 (66,7 %)
G2	-
G3	25/27 (92,6 %)
<i>Expresión ER/PR</i>	
ER+ PR+	4/6 (66,7%)
ER- PR-	21/22 95,5 %)
<i>Expresión ER/PR/HER2</i>	
ER+ PR+ HER2+	1/2 (50,0 %)
ER+ PR+ HER2-	3/4 (75,0 %)
ER- PR- HER2+	12/12 (100,0 %)
ER- PR- HER2-	9/10 (90,0 %)

Se realizó un análisis estadístico, comparando muestras de ganglio positivo frente a ganglio negativo, grado 3 frente a grado 1, y ER-PR- frente a ER + PR +. * Los números entre paréntesis indican porcentaje.

Tabla 3. Expresión de Brachyury en lesiones de carcinoma de mama metastásico por inmunohistoquímica usando un anticuerpo monoclonal murino anti-Brachyury

No. Pt	Sitio	Brachyury	
		% positividad	intensidad
6	Tumor primario de mama	30	+
6	ganglio linfático Met ⁺ (a)	90	+
6	ganglio linfático Met ⁺ (b)	90	+
6	Ganglio linfático sin met	neg	neg
9	Tumor primario de mama	focal	+
9	ganglio linfático Met ⁺ (a)	60	++
9	ganglio linfático Met ⁺ (b)	60	++
9	Ganglio linfático sin met	neg	neg
31	Pleura	90	+
32	Hueso	90	++
33	Hueso	90	+
34	Cerebro	70	++

Se analizaron tejidos tumorales primarios de mama coincidentes humanos y ganglios linfáticos metastásicos de dos pacientes en cuanto a la expresión de Brachyury por inmunohistoquímica. Las muestras de tejido tumoral primario de mama fueron de adenocarcinomas ductales infiltrantes. Se analizaron dos ganglios linfáticos positivos en cuanto a metástasis de cada paciente (a, b) y 1 ganglio linfático negativo en cuanto a metástasis de la misma paciente (c). Las lesiones metastásicas de pacientes adicionales también fueron analizadas en cuanto a la expresión de Brachyury por inmunohistoquímica. Los tejidos mamarios adyacentes y distales en las muestras fueron negativos para la expresión de Brachyury.

Las muestras de tejido tumoral primario de mama fueron de 30 adenocarcinomas ductales infiltrantes. La expresión de Brachyury para cada muestra se informa como tinción en linfocitos tumorales (% de positividad, intensidad), tinción en tejido adyacente de mama y tinción en tejido distal de mama.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, SEGÚN ESTÁ REPRESENTADO POR LA SECRETARÍA, DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS

5 <120> PROTEÍNA BRACHYURY, VECTORES NO DE POXVIRUS, NO DE LEVADURA QUE CODIFICAN PROTEÍNA BRACHYURY Y SU USO

<130> 714064

<150> US 61/701,525

<151> 14-09-2012

<160> 6

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 435

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 1

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
1 5 10 15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
20 25 30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
35 40 45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
50 55 60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
65 70 75 80

Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
85 90 95

Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
100 105 110

Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
115 120 125

Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
130 135 140

Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
145 150 155 160

Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
 165 170 175
 Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
 180 185 190
 Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile
 195 200 205
 Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser
 210 215 220
 Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly
 225 230 235 240
 Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro
 245 250 255
 Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser
 260 265 270
 Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
 290 295 300
 Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Ser
 355 360 365
 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
 405 410 415

ES 2 752 190 T3

Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
420 425 430

Pro Ser Met
435

<210> 2
<211> 2518
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

tttgccttttg cttatttccg tccatttccc tctctgcgcg cggaccttcc ttttccagat	60
ggtgagagcc gcggggacac ccgacgcgcg ggcaggctga tccacgatcc tgggtgtgog	120
taacgcgcgc tggggctccg tgggcgaggg acgtgtgggg acaggtgcac cggaaactgc	180
cagactggag agttgaggca tccgaggcgc gagaacagca ctactactgc ggcgagacga	240
gcgcggcgca tcccaaagcc cggccaaatg cgctcgtccc tgggagggga gggagggcgc	300
cctggagcgg ggacagtctt ggtccgcgc ctcctcccg gtctgtgccg ggaccggga	360
ccggggagcc gtcgcaggtc tccgtccaag gggccccttt tctcggaagg gcggcgcca	420
agagcaggga aggtggatct caggtagoga gtctgggctt cggggacggc ggggagggga	480
gccggacggg aggatgagct cccctggcac cgagagcgcg ggaaagagcc tgcagtaccg	540
agtggaccac ctgctgagcg ccgtggagaa tgagctgcag gcgggcagcg agaagggcga	600
ccccacagag cgcgaactgc gcgtgggcct ggaggagagc gagctgtggc tgcgcttcaa	660
ggagctcacc aatgagatga tccgtgaccaa gaacggcagg aggatgtttc cgggtgtgaa	720
ggtgaacgtg tctggcctgg accccaacgc catgtactcc ttctgtctgg acttcgtggc	780
ggcggacaac caccgctgga agtacgtgaa cggggaatgg gtgcgggggg gcaagcggga	840
gocgcaggcg ccagctgog totacatoca cccgactog cccaacttcg gggccactg	900
gatgaaggct ccgtctcct tcagcaaagt caagctcacc aacaagctca acggaggggg	960
ccagatcatg ctgaactcct tgcataagta tgagcctoga atccacatag tgagagttgg	1020
gggtccacag cgcagatga ccagccactg ctccctgag accagttca tagcgggtgac	1080
tgcttatcag aacgaggaga tcacagctct taaaattaag tacaatccat ttgcaaaagc	1140
tttccctgat gcaaaggaaa gaagtgatca caaagagatg atggaggaac ccggagacag	1200
ccagcaacct gggtaactcc aatgggggtg gcttcttcct ggaaccagca ccctgtgtoc	1260
acctgcaaat cctcatctc agtttgagg tgccctctoc ctccctoca cgcacagctg	1320
tgacaggtag ccaacctga ggagccaccg gtctcacc taccacagcc cctatgtca	1380
tccgaacaat totccaacct attctgacaa ctcacctgca tgtttatcca tgctgcaatc	1440

ccatgacaat tgggtccagcc ttggaatgcc tgcccatccc agcatgctcc ccgtgagcca 1500
 caatgccagc ccacctacca gctccagtca gtaccccagc ctgtggtctg tgagcaacgg 1560
 cgccgtcacc ccggggtccc aggcagcagc cgtgtccaac gggctggggg ccagttctt 1620
 ccgggggtcc ccgcgcact acacaccct caccatccg gtctcggcgc cctcttcctc 1680
 gggatcccca ctgtacgaag gggcgggcgc ggccacagac atcgtggaca gccagtacga 1740
 cgccgcagcc caaggccgcc tcatagcctc atggacacct gtgtcgccac cttccatgtg 1800
 aagcagcaag gccaggtcc cgaaagatgc agtgactttt tgtcgtggca gccagtggg 1860
 actggattga cctactaggt acccagtggc agtctcaggt taagaaggaa atgcagcctc 1920
 agtaacttcc ttttcaaagc agtggaggag cacacggcac ctttcccag agcccagca 1980
 tcccttgctc acacctgcag tagcgggtgt gtcccagggtg gcttacagat gaaccaact 2040
 gtggagatga tgcagttggc ccaacctcac tgacgggtgaa aaaatgtttg ccagggtcca 2100
 gaaacttttt ttggtttatt tctcatcacag tgtattggca actttggcac accagaattt 2160
 gtaactcca ccagtcctac tttagtgaaga taaaagcac actcttaatc ttcttccttg 2220
 ttgctttcaa gtagttagag ttgagctggt aaggacagaa taaaatcata gttgaggaca 2280
 gcaggtttta gttgaattga aaatttgact gctctgcccc ctagaatgtg tgtattttaa 2340
 gcatatgtag ctaatctctt gtgttggtta actataactg tttcatattt ttcttttgac 2400
 aaagtagcca aagacaatca gcagaaagca ttttctgcaa aataaacgca atatgcaaaa 2460
 tgtgattcgt ccagttatta gtgaagcccc tctttttgtg agtatttact gtttattg 2518

<210> 3

<211> 436

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 3

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
 1 5 10 15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser
 20 25 30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
 35 40 45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
 50 55 60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
 65 70 75 80

ES 2 752 190 T3

Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	Ala	Met	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Asp	Phe	Val	Thr		
				85					90					95			
Ala	Asp	Asn	His	Arg	Trp	Lys	Tyr	Val	Asn	Gly	Glu	Trp	Val	Pro	Gly		
			100					105					110				
Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ser	Cys	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Asp		
		115					120					125					
Ser	Pro	Asn	Phe	Gly	Ala	His	Trp	Met	Lys	Ala	Pro	Val	Ser	Phe	Ser		
	130					135						140					
Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Asn	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Met	Leu		
145					150					155					160		
Asn	Ser	Leu	His	Lys	Tyr	Glu	Pro	Arg	Ile	His	Ile	Val	Arg	Val	Gly		
			165						170					175			
Gly	Pro	Gln	Arg	Met	Ile	Thr	Ser	His	Cys	Phe	Pro	Glu	Thr	Gln	Phe		
			180					185					190				
Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Lys	Ile		
		195					200					205					
Lys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	Arg	Asn		
	210					215					220						
Asp	His	Lys	Asp	Val	Met	Glu	Glu	Pro	Gly	Asp	Cys	Gln	Gln	Pro	Gly		
225					230					235					240		
Tyr	Ser	Gln	Trp	Gly	Trp	Leu	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Thr	Leu	Cys	Pro		
			245						250					255			
Pro	Ala	Ser	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser		
			260					265						270			
Thr	His	Gly	Cys	Glu	Arg	Tyr	Pro	Ala	Leu	Arg	Asn	His	Arg	Ser	Ser		
		275					280					285					
Pro	Tyr	Pro	Ser	Pro	Tyr	Ala	His	Arg	Asn	Ser	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ala		
	290					295					300						
Asp	Asn	Ser	Ser	Ala	Cys	Leu	Ser	Met	Leu	Gln	Ser	His	Asp	Asn	Trp		
305					310					315					320		
Ser	Ser	Leu	Gly	Val	Pro	Gly	His	Thr	Ser	Met	Leu	Pro	Val	Ser	His		

	325		330		335										
Asn	Ala	Ser	Pro	Pro	Thr	Gly	Ser	Ser	Gln	Tyr	Pro	Ser	Leu	Trp	Ser
			340					345					350		
Val	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Thr	Pro	Gly	Ser	Gln	Thr	Ala	Gly	Val	Ser
		355					360					365			
Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	His	Tyr	Thr
	370					375					380				
Pro	Leu	Thr	His	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser
385					390					395					400
Pro	Met	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Asp	Ile	Ser	Asp	Ser	Gln
				405					410					415	
Tyr	Asp	Thr	Ala	Gln	Ser	Leu	Leu	Ile	Ala	Ser	Trp	Thr	Pro	Val	Ser
			420					425					430		
Pro	Pro	Ser	Met												
			435												

<210> 4
 <211> 2046
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 4

ggctccgcag agtgaccctt tttcttgga aagcgggtggc gagagaagtg aaggtggctg	60
ttgggtaggg agtcaagact cctggaaggt ggagaggggtg gcgggaggat gagctcgccg	120
ggcacagaga ggcaggggaa gagcctgcag taccgagtg accacctgct cagcgccgtg	180
gagagcgagc tgcagggcggg cagcgagaag ggagacccca ccgaacgcga actgcgagtg	240
ggcctggagg agagcgagct gtggctgcgc ttcaaggagc taactaacga gatgattgtg	300
accaagaacg gcaggaggat gttcccgggtg ctgaaggtaa atgtgtcagg cctggacccc	360
aatgccatgt actctttctt gctggacttc gtgacggctg acaaccaccg ctggaaatat	420
gtgaacgggg agtgggtacc tgggggcaaa ccagagcctc aggcgcccag ctgcgtctac	480
atccacccag actcgcccaa ttttggggcc cactggatga aggcgcctgt gtctttcagc	540
aaagtcaaac tcaccaacaa gctcaatgga gggggacaga tcatgttaaa ctcccttgc	600
aagtatgaac ctcgattca catcgtgaga gttgggggcc cgcaacgc	660
cactgctttc ccgagaccca gttcatagct gtgactgcct accagaatga ggagattaca	720
gcccttaaaa ttaaatacaa cccatttgct aaagccttcc ttgatgccaa agaaagaaac	780

gaccacaaag atgtaatgga ggaacggggg gactgccagc agccggggta ttcccaatgg 840
 ggggtggcttg ttcttgggtg tggcacccctc tggccgcctg ccagctccca ccctcagttt 900
 ggaggctcgc tctctctccc ctccacacac ggctgtgaga ggtacccagc tctaaggaac 960
 caccggtcac cgccctaccc cagcccttat gctcatcgga acagctctcc aacctatgcg 1020
 gacaattcat ctgcttgtct gtccatgctg cagtcccatg ataactggtc tagcctcgga 1080
 gtgcctggcc acaccagcat gctgcctgtg agtcataacg ccagcccacc tactggctct 1140
 agccagtatc ccagtctctg gtctgtgagc aatggtagca tcacccagc ctcccagaca 1200
 gctgggggtgt ccaacgggct gggagctcag ttctttcgag gctccctgc acattacaca 1260
 ccactgacgc acacgggtctc agctgccagc tctctgtctt ctggttctcc gatgtatgaa 1320
 ggggctgcta cagtcacaga cttttctgac agccagtatg acacggccca aagcctcctc 1380
 atagcctcgt ggacacctgt gtcaccccca tctatgtgaa ttgaactttc ctccatgtgc 1440
 tgagacttgt aacaaccggt gtcaactgga tcttctaggc tcaaagtggc aggctcttgg 1500
 gacaagggaa aaataaataa ataaaagcta gatactaaca actccathtt caaataagag 1560
 caataatata tgtcctataa tcatgttcta cagcctcttg tttgatacct acagtagtga 1620
 tatgtgtcct acattatgaa gccaaaggaca gagagacggc tgtgggtccag ttttttgtga 1680
 ctggcagtta atcagagtcc tttgctaggt agggctctat atcttgtgtt tctctacaac 1740
 atatatgtga ctttgaaatc ctggaattcg tccacccctt gtctactttt agtgagacac 1800
 aaggtacacc tctaattgtc tcccttgttg ccttagagta gtttaactttg aggacagaaa 1860
 aaagcatagc cagaagattg taactgaacc gtcaactgtt ctgcccttgg aacatgccta 1920
 cttaagcac acgtagcttt ttgtgttggg aagtcaactg tatggatact tttctgttga 1980
 caaagtagcc aaagacaatc tgcagaaagt gttttctgca caataaaggc aatatatagc 2040
 acctgg 2046

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 5

Arg Pro Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

5 <400> 6

Gln	Trp	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Cys	Pro	Pro
1				5					10					15

10

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad eficaz de un vector adenoviral que codifica

- (a) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 que se une específicamente a la molécula de histocompatibilidad mayor Clase II (clase de MHC); o
- (b) un polipéptido que comprende al menos 15 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 que se une específicamente a la molécula de histocompatibilidad mayor Clase II (MHC);

para su uso en un método para inducir una respuesta inmune para Brachyury, donde la respuesta inmune comprende una respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury, preferentemente, comprende además una respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de Brachyury, y donde el sujeto es preferentemente un ser humano.

2. La cantidad eficaz del vector adenoviral de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la medición de la respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos de Brachyury.

3. La cantidad eficaz del vector adenoviral de la reivindicación 1 o 2 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el sujeto tiene cáncer y donde el cáncer es preferentemente un cáncer resistente a quimioterapia o un cáncer resistente a radiación.

4. La cantidad eficaz del vector adenoviral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polipéptido comprende

(a) de 15 a 435 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1; o

(b) al menos 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1.

5. La cantidad eficaz del vector adenoviral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el vector adenoviral comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula inmunoestimuladora, donde la molécula inmunoestimuladora se selecciona del grupo que consiste en IL-2, ICAM-1, LFA-3, CD72, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-6.

6. La cantidad eficaz del vector adenoviral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un adyuvante, donde el adyuvante es preferentemente quitosano.

7. La cantidad eficaz del vector adenoviral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente,

donde el segundo agente es un agente quimioterapéutico, radiación o una molécula pequeña terapéutica dirigida o anticuerpos monoclonales, preferentemente, el segundo agente es un inhibidor de receptor de factor de crecimiento epitelial, un inhibidor de factor de crecimiento de transformación (TGF)- β o un inhibidor de tirosina quinasa.

8. La cantidad eficaz del vector adenoviral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el vector adenoviral codifica una molécula co-estimuladora, donde la molécula co-estimuladora es preferentemente una o más entre B7-1, B7-2, LFA e ICAM-1.

9. La cantidad eficaz del vector adenoviral de la reivindicación 3 para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata o leucemia linfocítica crónica (CLL).

10. La cantidad eficaz del vector adenoviral de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde el método es un método para prevenir cáncer en el sujeto, donde preferentemente, el sujeto está en riesgo de desarrollar cáncer.

11. La cantidad eficaz del vector adenoviral de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 y 10 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 y 10, donde el sujeto tiene una neoplasia intraepitelial prostática de grado alto, poliposis adenomatosa familiar o atipia del pecho.

FIG. 1

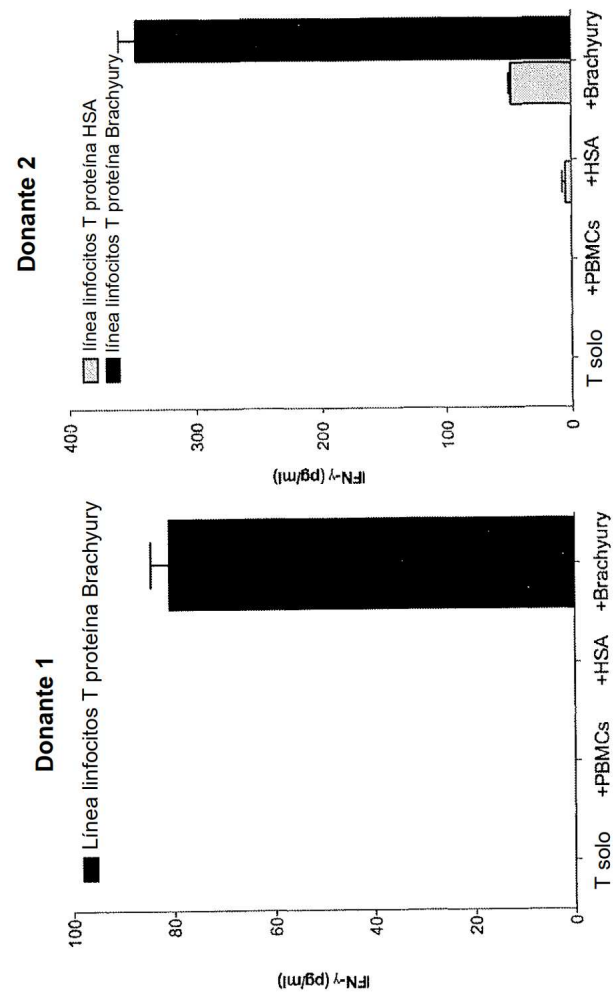


FIG. 2

Péptido	IL-2	IL-8	IL12p70	IL-1b	GM-CSF	IFN γ	IL-6	IL-10	TNF α
Brachyury clase II B	223	586	3,0	4,0	4720	306	11,0	4058	817
Brachyury clase II A	1,7	4,3	7,6	4,1	13	55,6	2,7	21,7	14,4

Línea linfocitos T CD4 es específica T-/BRA para epítipo QGWLLPGTSTLCPP (Brachyury clase II B)
Brachyury clase II A = RPMFPVLKVNVSGLD; Brachyury clase II B = QWGWLLPGTSTLCPP

FIG. 3A

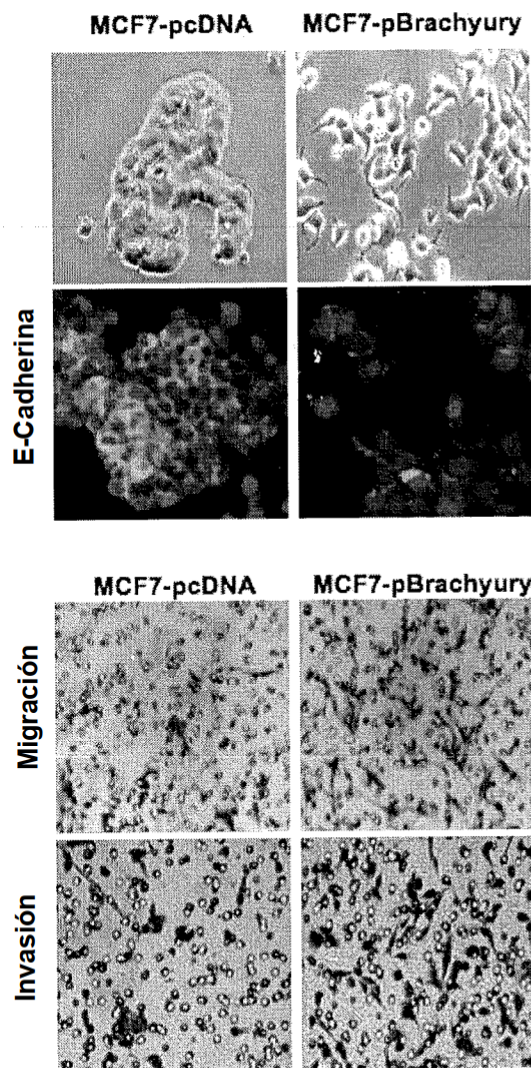


FIG. 3B

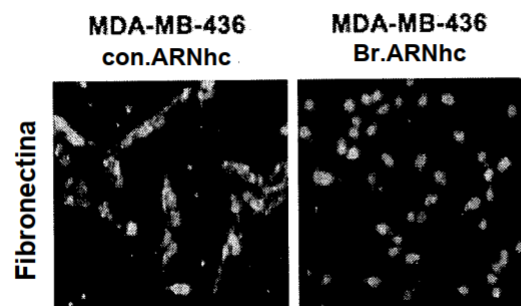


FIG. 3E

FIG. 3C

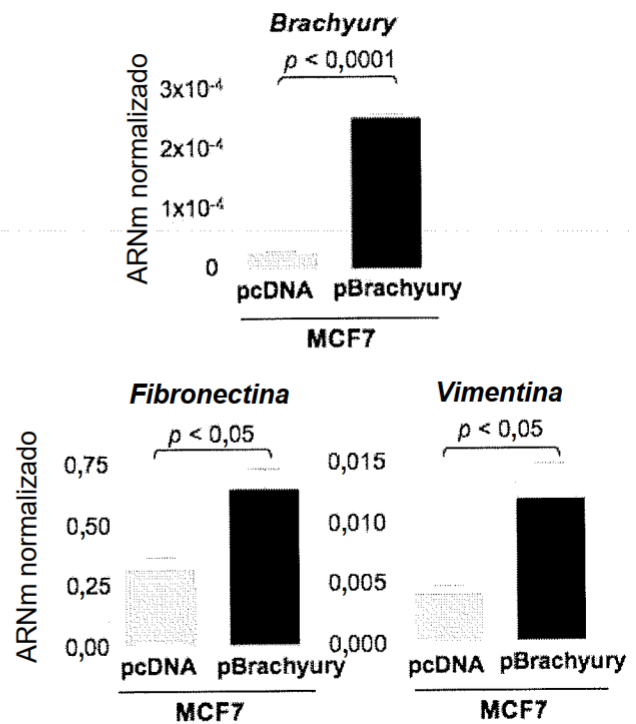


FIG. 3D

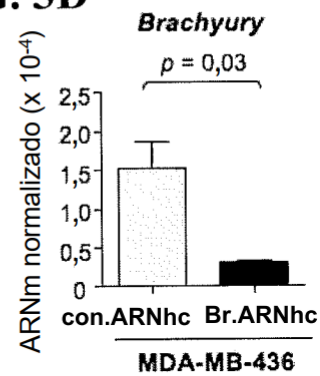
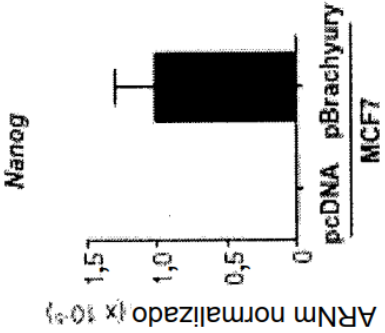
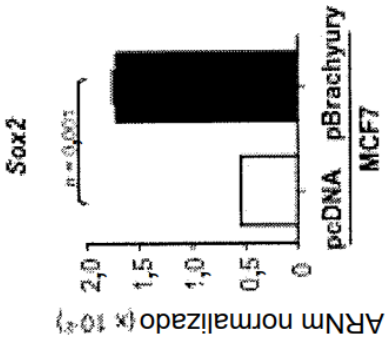
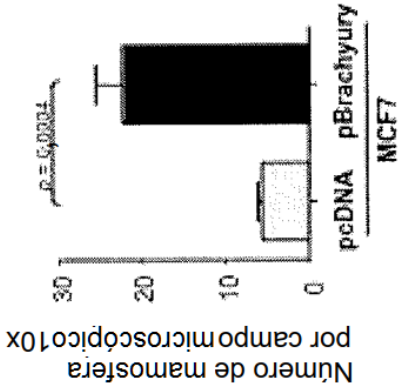
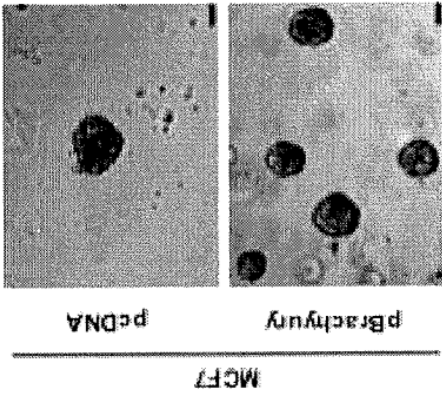


FIG. 4A



Cultivo secundario de mamofera



Cultivo secundario de mamofera

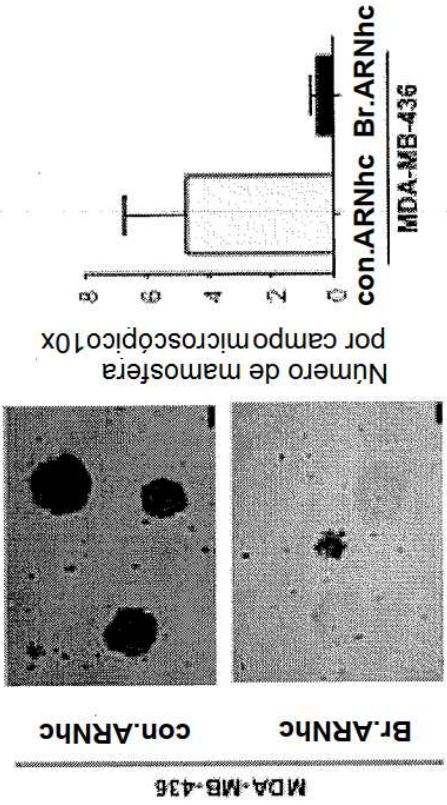


FIG. 4B

FIG. 4D

FIG. 4C

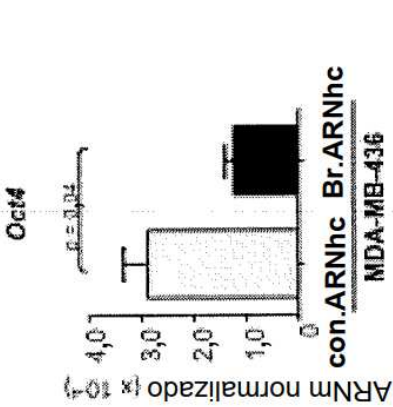
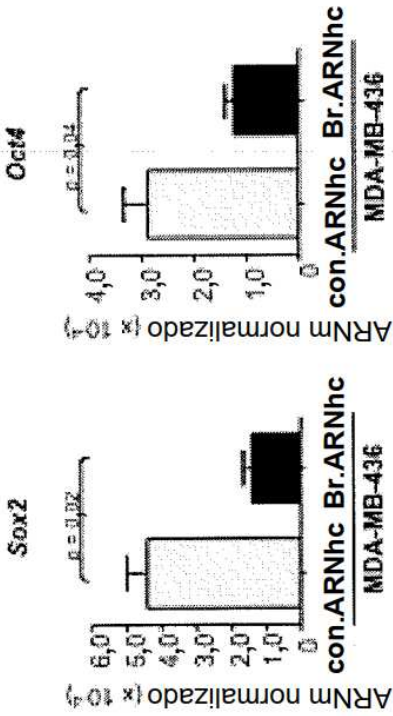


FIG. 5A

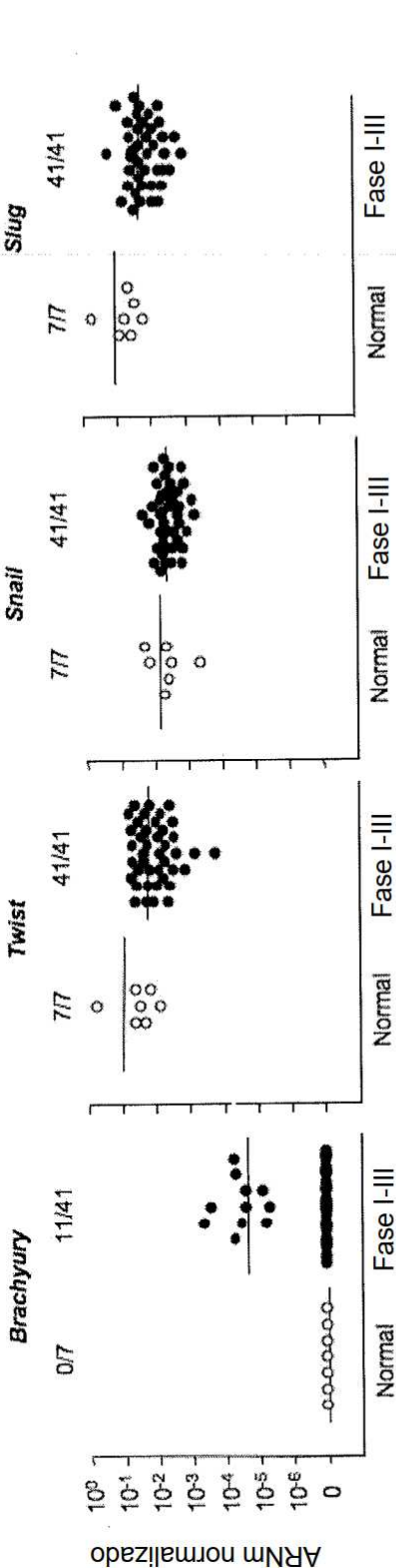


FIG. 5B

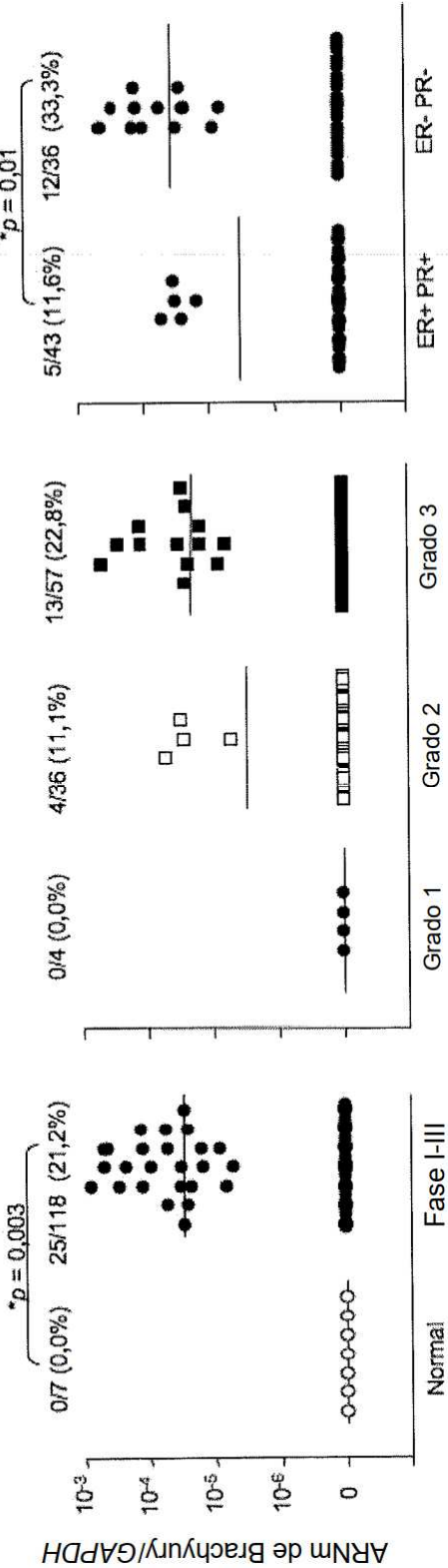


FIG. 5C

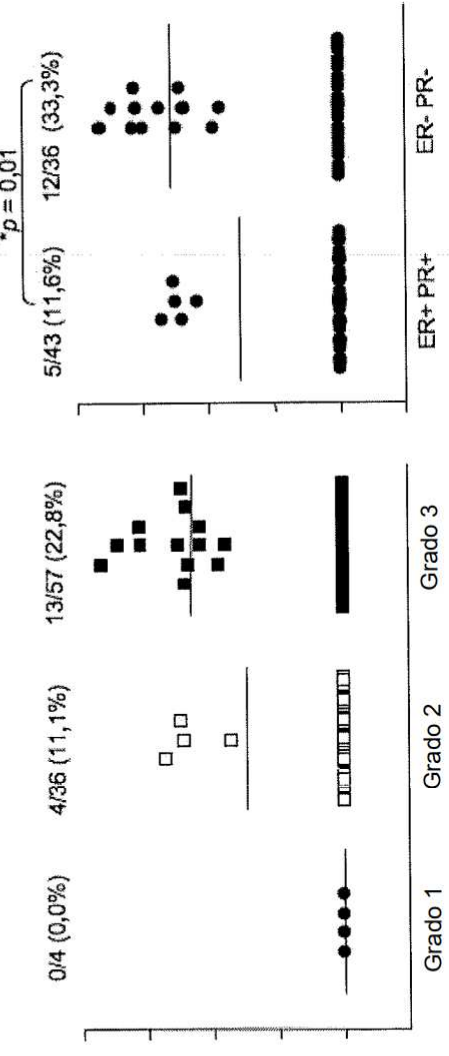


FIG. 5D

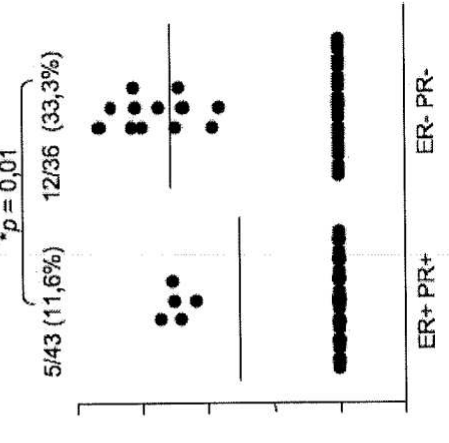


FIG. 6A

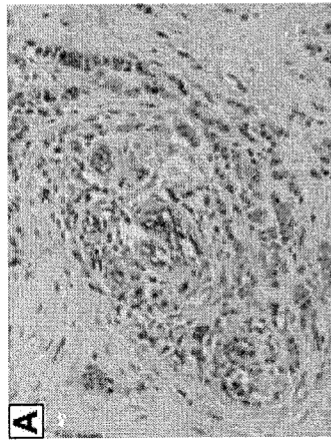


FIG. 6B

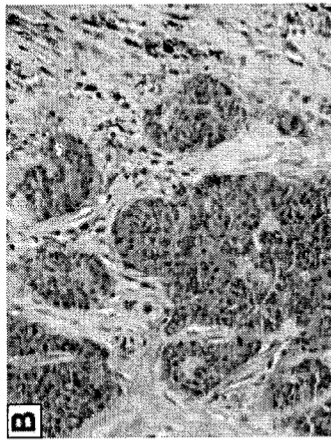


FIG. 6C



FIG. 6D

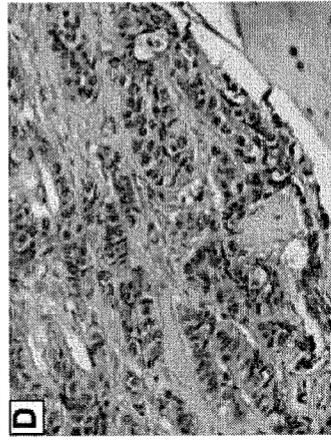


FIG. 6E

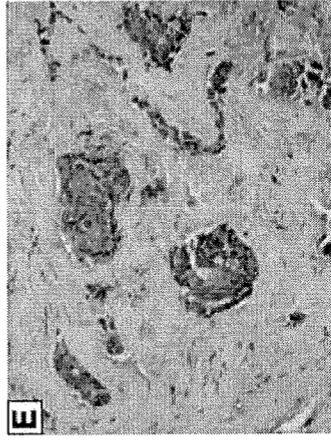


FIG. 6F

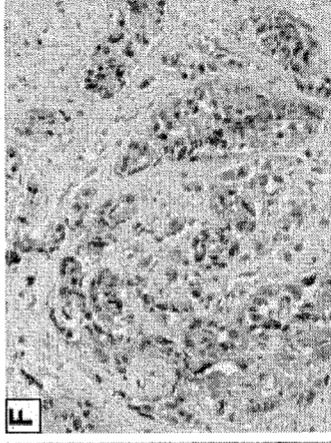
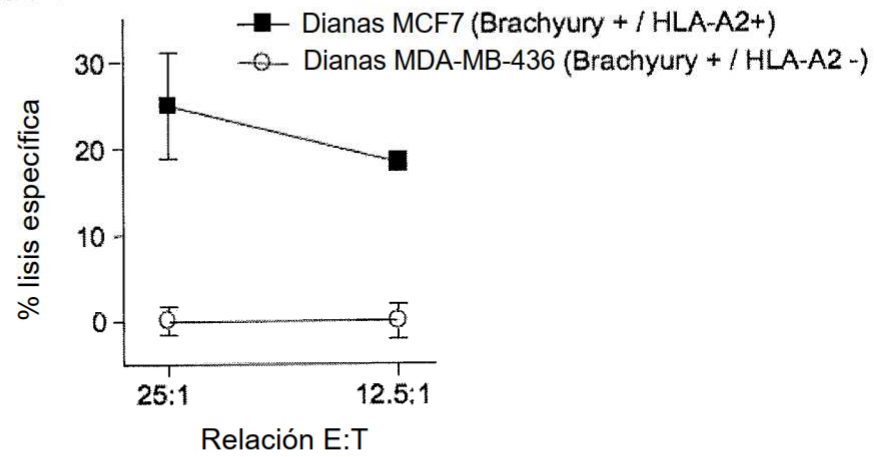


FIG. 7A

Título IgG	Donantes normales	Pacientes con cáncer de mama	valor <i>p</i>
≤1:100 (negativo)	17/20	6/19	0,0004
1:100-1:400	2/20	5/19	0,1940
≥ 1:400	1/20	8/19	0,0050

FIG. 7B**FIG. 7C**