



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 788**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01931269 .3**

86 Fecha de presentación : **07.05.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1282702**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

54 Título: **Polipéptidos inmunógenos codificados por minigenes MAGE y sus utilizaciones.**

30 Prioridad: **10.05.2000 US 202970 P**
11.05.2000 US 203578 P
20.10.2000 US 242388 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **Sanofi Pasteur Limited**
Connaught Campus, 1755 Steeles Avenue West
Toronto, ON M2R 3T4, CA
LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

72 Inventor/es: **Berinstein, Neil;**
Tartaglia, Jim;
Tine, John, A.;
Moingeon, Philippe;
Boon-Falleur, Thierry y
Van der Bruggen, Pierre

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 276 788 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

Polipéptidos inmunógenos codificados por minigenes MAGE y sus utilizaciones.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inmunología, en particular a nuevos polipéptidos que comprenden varios epítomos del antígeno específico para MAGE seleccionados de entre diferentes (es decir, discretos) miembros de la familia de la proteína MAGE, a los ácidos nucleicos que los codifican, a los virus recombinantes que comprenden dicho ácido
10 nucleico, a las células que comprenden dichos ácidos nucleicos, a las composiciones de los mismos y a su utilización como agentes inmunógenos.

Antecedentes de la invención

15 Las expectativas de la inmunoterapia del cáncer se basan en la identificación de los antígenos asociados al tumor que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario. Específicamente, los antígenos diana que producen respuestas mediadas por linfocitos T son de interés crítico. Esto procede de las pruebas de que los linfocitos T citotóxicos (CTL) pueden producir la regresión del tumor tanto en modelos animales (Kast W. *et al.* (1989) *Cell* 59:6035; Greendberg P. (1991) *Adv. Immunol.* 49:281) como en seres humanos (Boon T. *et al.* (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:337). Los
20 antígenos reconocidos por los CTL están constituidos por péptidos que se originan en proteínas endógenas presentadas en asociación con moléculas de Complejo de Histocompatibilidad principal (MHC).

El primero de dichos tumores humanos asociado al antígeno caracterizado se identificó en un melanoma. Este antígeno (inicialmente denominado MAGE 1) se identificó utilizando CTL aislados en un paciente de melanoma HLA
25 A1+ para identificar las células diana HLA A1 transfectadas con ADN tumoral (van der Bruggen P. (1991) *Science* 254:1643; dichos antígenos asociados al tumor se denominan actualmente MAGE-A1, MAGE-A2, etc. para los fines de esta solicitud se adoptará la antigua denominación). De manera interesante, se observó que MAGE 1 pertenece a una familia de por lo menos 12 genes íntimamente relacionados situados en el cromosoma X (de Plaen, E. *et al.* (1994) *Immunogenetics* 40:360). La secuencia de ácido nucleico de los 11 genes MAGE adicionales comparte entre el 65 y
30 el 85% de identidad con la de MAGE-1 (de Smet, C. *et al.* (1994) *Immunogenetics* 39: 121). Tanto MAGE 1 como 3 están presentes en los tejidos normales, pero se expresan únicamente en los testículos (de Plaen, E. *et al.* (1994) *Supra*; de Smet, C. *et al.* (1994) *Supra*; Takahashi, K. *et al.* (1995) *Cancer Res.* 55:3478; Chomey, P. *et al.* (1995) *Immunogenetics* 43:97). Estos resultados iniciales se han ampliado posteriormente con la identificación de nuevas familias de genes (es decir RAGE, BAGE, GAGE), que en su totalidad no están típicamente expresadas en tejidos
35 normales (excepto en los testículos) sino expresadas en una variedad de tipos tumorales.

MAGE-1 y MAGE-3 se expresan en el 48% y 76% de melanomas metastásicos respectivamente (Brasseur, F. *et al.* (1995) *Int. J. Cancer* 63:375), entre el 35% y el 30% del cáncer pulmonar no microcítico ("NSCLC"; Weynants, P. *et al.* (1994) *Int. J. Cancer* 56:826), entre el 27% y el 48% de carcinomas de células epidermoides de la cabeza y cuello
40 (Eura, M. *et al.* (1995) *Int. J. Cancer* 64:304), entre el 62% y el 57% de carcinomas de células epidermoides del esófago (Inoue, H. *et al.* (1995) *Int. J. Cancer* 63:523), y entre el 21% y el 35% de carcinomas de células de transición de la vejiga (Patard, J. J. *et al.* (1995) *Int. J. Cancer* 64:60). Existen también expresadas (aunque menos frecuentemente) en tumores de otros tipos histológicos tales como tumores de mama, sarcomas de tejido blando y carcinoma prostático (Brasseur, F. *et al.* (1992) *Int. J. Cancer* 52:839; Van der Eynde *et al.* (1995) *Curr. Opin. Immunol.* 7:674). El gen
45 MAGE 3 se expresa también en el carcinoma colorrectal.

Numerosos epítomos/péptidos inmunógenos procedentes de las proteínas MAGE (en particular MAGE 1, 2 y 3) se han identificado y caracterizado (estudiados en van der Eynde, B. J. y Boon, T. (1997) *Int. J. Chem. Lab. Res.* 27:81). Los CTL aislados de dos pacientes de melanoma se observó que reconocen a los péptidos procedentes de MAGE-1
50 presentados en asociación con HLA-A1, B37 o Cw16 (Traversi C. *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176:1453; Tanzarella, S. *et al.* (1999) *Cancer Res.* 59:2668; van der Bruggen, P. *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2134). En particular, se demostró que el nonapéptido EADPTGHSY (aminoácidos 161 a 169 de MAGE 1) era presentado a las células del sistema inmunitario junto con la molécula HLA-A1 de clase I MHC (Traversi, C. *et al.* (1992) *Supra*). Los péptidos sintéticos utilizados para estimular los linfocitos T han facilitado también la identificación de un epítomo de MAGE 1
55 presentado por HLA-A24 (Fujie, T. *et al.* (1999) *Int. J. Cancer* 80:169).

Se ha demostrado asimismo que MAGE-3 dirige la expresión de numerosos antígenos reconocidos por los CTL. Por ejemplo, el nonapéptido EVDPIGHLY (aminoácidos 168 a 176 de MAGE 3) es reconocido junto con la molécula
60 HLA-A1 de clase I MHC (Gaugler, B. *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:921); el decapéptido MEVDPIGHLY (aminoácidos 167 a 176) junto con las moléculas HLA-B44.02 y HLA-B44.03 de clase I de MHC (Herman, J. *et al.* (1996) *Immunogenetics* 43:377); el nonapéptido FLWGPRALV (aminoácidos 271 a 279) junto con la molécula HLA-A2.01 de clase I de MHC (van der Bruggen, P. *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:3038). Además, van der Bruggen y colegas han identificado seis epítomos adicionales procedentes de MAGE que se presentan a CTL junto con HLA-A3, A28, B7, B53, Cw2 y Cw3 (Chaux, P. *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:2928; Luiten, R. *et al.* (2000), *Tissue Antigens*, 55:en
65 imprenta). De manera interesante, se ha observado recientemente que un epítomo de MAGE 1 identificado anteriormente como un epítomo reconocido por CTL junto con HLA-A1 puede también ser presentado a CTL junto con tanto HLA-B3501 como B3503 (van der Bruggen, P. *et al.* (2000), propuesto).

La presente invención da a conocer nuevos polipéptidos que comprenden varios epítomos distintos del antígeno específico para MAGE seleccionados de entre diferentes (es decir discretos) miembros de la familia de la proteína MAGE, ácidos nucleicos que codifican a éstos, virus recombinantes y/o células que comprenden dichos ácidos nucleicos, composiciones de los agentes mencionados anteriormente y su utilización en la generación de respuestas inmunitarias específicas para MAGE.

Sumario de la invención

La presente invención comprende péptidos inmunógenos que comprenden un fragmento de una proteína MAGE-1 que comprende un primer epítipo del antígeno específico para MAGE que presenta la secuencia EADPTGHSY y un fragmento de una proteína MAGE-3 que comprende un segundo epítipo del antígeno específico para MAGE que presenta la secuencia EVDPIGHLY. Los aspectos adicionales de la invención contienen los polipéptidos en los que dichos epítomos del antígeno específico para MAGE están unidos directamente o se unen mediante una secuencia enlazadora de aminoácidos.

En un aspecto adicional de la invención, el polipéptido comprende un primer epítipo del antígeno específico para MAGE procedente de MAGE 1 que presenta la secuencia de aminoácidos EADPTGHSY y un segundo epítipo del antígeno específico para MAGE procedente de MAGE-3 que presenta la secuencia de aminoácidos EVDPIGHLY. Incluso en aspectos adicionales, el polipéptido consiste en/comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. n°: 1 (Figura 2).

Como se apuntó anteriormente, los aspectos de la invención contienen los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente. Por consiguiente, los aspectos de la invención consisten en/comprenden la secuencia de ácido nucleico de SEC. ID. n°: 2 (Figura 1). En aspectos adicionales de la invención, el ácido nucleico es un ADN seleccionado de entre el grupo constituido por ácido nucleico vírico, plásmido, ADN bacteriano, ADN desnudo/libre y ARN. Incluso en aspectos adicionales, el ácido nucleico vírico se selecciona de entre el grupo constituido por adenovirus, alfa-virus y poxvirus. Incluso todavía en formas de realización adicionales, el poxvirus se selecciona de entre el grupo constituido por ALVAC, NYVAC, TROVAC y MVA.

Los aspectos específicos de la invención contienen además virus recombinantes en los que se inserta un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, en el que el virus recombinante produce la expresión de polipéptido en una célula infectada. En un aspecto adicional de la invención, las células infectadas con dichos virus recombinantes son capaces de provocar una respuesta inmunitaria dirigida contra:

- (i) el polipéptido; y/o
- (ii) un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido; y/o
- (iii) una proteína MAGE o un fragmento de la misma que comprende un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido; y/o
- (iv) células que expresan la proteína MAGE o fragmentos de la misma, el polipéptido y un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido; y/o
- (v) células que unen dicha proteína MAGE o fragmentos de la misma, el polipéptido y un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido.

Aspectos adicionales de la invención contienen virus recombinantes seleccionados del grupo constituido por adenovirus, alfavirus y poxvirus; las formas de realización específicas contienen ALVAC.

Aspectos adicionales de la invención contienen las composiciones de los polipéptidos, ácidos nucleicos y virus recombinantes mencionados anteriormente. Estas composiciones pueden opcionalmente incluir adyuvantes.

La invención proporciona además células que comprenden el(los) ácido(s) nucleico(s) mencionado(s) anteriormente, en las que dichas células expresan un polipéptido de la invención. En aspectos adicionales de la invención, las células unen los fragmentos de escisión de un polipéptido de la invención (estos últimos fragmentos son producidos opcionalmente por una proteasa). Incluso todavía en aspectos adicionales, las células que expresan el polipéptido también expresan una molécula MHC HLA de clase I. Incluso todavía en aspectos adicionales, las células que expresan el polipéptido son células que presentan el antígeno.

La invención proporciona además un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un animal dirigida contra:

- (i) el polipéptido; y/o
- (ii) un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido; y/o

(iii) una proteína MAGE o un fragmento de la misma que comprende un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido; y/o

(iv) células que expresan la proteína MAGE o fragmentos de la misma, el polipéptido y un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido; y/o

(v) células que unen dicha proteína MAGE o fragmentos de la misma, el polipéptido y un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido.

que comprende administrar a dicho animal un polipéptido, o un ácido nucleico, o un virus recombinante, o una célula de la invención en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria.

La invención todavía en un aspecto adicional proporciona un tratamiento para el cáncer que comprende cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente para producir respuestas inmunitarias.

La invención todavía en un aspecto adicional proporciona la utilización de los polipéptidos de la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos aunque indican formas de realización específicas de la invención se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

Breve descripción de las figuras

La invención se entenderá mejor haciendo referencia a los dibujos en los que:

La Figura 1 presenta una secuencia de ADN de una sola cadena que comprende Minigén de MAGE 1/3 codificado por ésta (SEC. ID. n°: 2) correspondiente a la inserción del montaje ALVAC(1)- Minigén de MAGE 1/3 denominado vCP1469A.

La Figura 2 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. n°: 1) del Minigén de MAGE 1/3 codificado por la secuencia de ADN de la Figura 1.

La Figura 3 describe una representación esquemática del perfil de la cartografía de restricción de *Xho I* del montaje ALVAC(1)- Minigén de MAGE 1/3 (vCP1469A).

La Figura 4 presenta los datos que describen la capacidad del montaje ALVAC(1)- Minigén de MAGE 1/3 (vCP1469A) de la Figura 3 para expresar el epítipo del antígeno específico tanto de MAGE 1 como de 3 después de la infección de células dendríticas con virus recombinante que comprende dicho montaje de ALVAC.

La Figura 5 presenta los datos que describen la capacidad del epítipo del antígeno específico de MAGE 1 procedente del montaje ALVAC(1)- Minigén de MAGE 1/3 (vCP1469A) de la Figura 3 para presentarse en asociación con ambas moléculas MHC HLA-A1 y HLA-B35.

La Figura 6 presenta los datos que describen la capacidad del epítipo del antígeno específico de MAGE 3 procedente del montaje ALVAC(1)- Minigén de MAGE 1/3 (vCP1469A) de la Figura 3 para presentarse en asociación con las moléculas MHC HLA-B35.

Descripción detallada de la invención

Todos los agentes y composiciones de la invención presentan la capacidad de producir o provocar una respuesta inmunitaria contra dicho polipéptido, un epítipo del antígeno específico para MAGE de dicho polipéptido, una proteína MAGE o un fragmento de la misma que comprende un epítipo del antígeno específico para MAGE de dicho polipéptido o las células que se unen y/o que expresan el polipéptido mencionado anteriormente, un epítipo del antígeno específico para MAGE, una proteína MAGE o un fragmento de la misma. Una "respuesta inmunitaria" se define como cualquier respuesta del sistema inmunitario, por ejemplo, de naturaleza mediada por células (es decir, mediada por linfocitos T citotóxicos) o humoral (es decir, mediada por anticuerpos).

Dentro del contexto de las respuestas inmunitarias mediadas por células, las proteínas antigénicas asociadas al tumor (tales como los miembros de la familia MAGE) son procesadas por proteasas intracelulares en péptidos de epítipo más pequeños que se transportan posteriormente a la superficie de la célula íntimamente unida en una hendidura sobre una molécula MHC HLA de clase I. Los linfocitos T reconocen estos pequeños péptidos del epítipo solamente cuando se presentan en asociación con las moléculas MHC HLA de clase I sobre la superficie de células apropiadas. Asimismo, en el contexto de las respuestas inmunitarias humorales las proteínas pueden procesarse en péptidos de epítopos más pequeños que se presentan posteriormente sobre las superficies celulares (es decir, células que presentan el antígeno) en asociación con moléculas MHC HLA de clase II. Dichos complejos son reconocidos por células apropiadas del sistema inmunitario humoral.

Como es bien conocido por los expertos en la materia, los péptidos cortos (es decir, epítomos) compuestos de secuencias de aminoácidos de aproximadamente 9 a 12 amino-ácidos procedentes de antígenos son capaces de unirse directamente en el interior de la hendidura de una molécula HLA de clase 1 sin tratamiento intracelular. Como se indicó anteriormente, se ha identificado un número de dichos péptidos epitópicos procedentes de proteínas MAGE (es decir, epítomos antigénicos específicos para MAGE). Además, se ha demostrado la capacidad de algunos de los epítomos antigénicos específicos para MAGE para producir/provocar respuestas inmunitarias en las que se lisan células diana apropiadas que expresan a MAGE. Los polipéptidos de la presente invención provocan una respuesta inmunitaria mejor a las células diana apropiadas que expresan a MAGE en comparación con la observada cuando solamente se emplea como inmunógeno un único epítomo antigénico específico para MAGE. Además, la selección apropiada de epítomos proporcionará la ventaja de un polipéptido inmunógeno capaz de provocar o producir una respuesta inmunitaria en una población de individuos no restringida a una sola subclase MHC HLA. Además, la unión de los epítomos antigénicos específicos para MAGE en un solo polipéptido permite la administración de un solo inmunógeno a individuos (en contraste con una mezcla de distintos péptidos individuales). Como tal, el polipéptido se trata de manera apropiada para permitir a los epítomos antigénicos individuales específicos para MAGE contenidos en éste que se presenten en asociación con las moléculas HLA de clase 1 aplicables en superficies celulares aplicables.

Los epítomos antigénicos individuales específicos para MAGE que comprenden el polipéptido de la presente invención pueden variar cada uno en el número de aminoácidos, comprendiendo típicamente entre aproximadamente 9 y 10 aminoácidos. En una forma de realización de la invención, los epítomos antigénicos específicos para MAGE comprenden cada uno 9 aminoácidos.

Los epítomos antigénicos específicos para MAGE 1 se dan a conocer en las patentes U.S. n° 5.405.940, n° 5.695.994 y n° 5.843.448 y están publicadas en la solicitud PCT WO 9504542; numerosos epítomos antigénicos específicos para MAGE 2 se dan a conocer en las patentes U.S. n° 5.554.724, n° 5.686.068 y están publicados en la solicitud PCT WO 9525530; numerosos epítomos antigénicos específicos para MAGE 3 se dan a conocer en las patentes U.S. n° 5.462.871, n° 6.025.474, n° 5.851.523, n° 5.965.535, n° 5.554.506, n° 5.591.430 y n° 5.585.461 y están publicados en las solicitudes PCT WO 9525739, WO 9626214 y WO 9731017; y los epítomos antigénicos específicos para MAGE 6 se dan a conocer en la solicitud PCT publicada WO 9810780.

El polipéptido de la presente invención comprende un fragmento de una proteína MAGE-1 que comprende un primer epítomo antigénico específico para MAGE que presenta la secuencia EADPTGHSY y un fragmento de una proteína MAGE-3 que comprende un segundo epítomo antigénico específico para MAGE que presenta la secuencia EVDPIGHLY. Debe observarse que los epítomos mencionados anteriormente comprendidos por las formas de realización del polipéptido de esta invención pueden unirse directamente o conectarse por una secuencia enlazadora de aminoácidos. Dichas secuencias enlazadoras de aminoácidos para unir los epítomos antigénicos específicos para MAGE pueden comprender entre 1 y aproximadamente 25 aminoácidos. En una forma de realización, el enlazador comprende 16 aminoácidos. En formas de realización adicionales de la invención, el polipéptido y/o la secuencia enlazadora de aminoácidos comprende además una secuencia de aminoácidos escindible por actividad proteolítica. Una forma de realización específica de la invención consiste en el polipéptido cuya secuencia está indicada por SEC. ID. n°: 1 (Figura 2).

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse utilizando una variedad de procedimientos conocidos por un experto en la materia. Por consiguiente, pueden utilizarse procedimientos de ADN recombinante para proporcionar estos polipéptidos. Las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de la invención pueden incorporarse de manera conocida en vectores de expresión apropiados (es decir, vectores de expresión recombinantes). Los posibles vectores de expresión incluyen (pero no se limitan a) cósmidos, plásmidos o virus modificados (p. ej. retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados, lentivirus, poxvirus), siempre que el vector sea compatible con la célula hospedadora utilizada. La expresión "vector es compatible con la célula hospedadora" se define como que contempla que el(los) vector(es) de expresión contiene(n) una molécula de ácido nucleico de la invención (descrita a continuación) y que ayudan a la(s) secuencia(s) reguladora(s) seleccionada(s) sobre la base de la(s) célula(s) hospedadora(s) que debe utilizarse para la expresión, estando dicha(s) secuencia(s) reguladora(s) ligada(s) funcionalmente a la molécula de ácido nucleico. "Funcionalmente ligada" quiere decir que el ácido nucleico está ligado a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de tal manera que permite la expresión del ácido nucleico. Las secuencias reguladoras adecuadas pueden proceder de varias fuentes, incluyendo genes bacterianos, micóticos o víricos. (Por ejemplo, véanse las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). La selección de la(s) secuencia(s) reguladora(s) apropiada(s) depende de la(s) célula(s) hospedadora(s) seleccionada(s), y puede llevarse a cabo fácilmente por un experto en la materia. Ejemplos de dichas secuencias reguladoras incluyen las siguientes: un activador y potenciador de transcripción, una secuencia de fijación de ARN polimerasa o una secuencia de fijación ribosómica (incluyendo una señal de iniciación de la traducción). Dependiendo de la célula hospedadora seleccionada y del vector empleado, pueden incorporarse otras secuencias adicionales (tal como un origen de replicación, secuencias de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que proporcionan inducibilidad de transcripción) en el vector de expresión.

Los vectores de expresión de la invención mencionados anteriormente pueden contener además un gen marcador seleccionable que facilita la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Ejemplos de genes marcadores seleccionables son los genes que codifican una proteína tal como G418 e higromicina (que proporciona resistencia a determinados fármacos), β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa o luciferasa de luciérnaga.

La transcripción del gen marcador seleccionable se controla mediante cambios en la concentración de la proteína del marcador seleccionable tal como β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa o luciferasa de luciérnaga. Las células transformadoras pueden seleccionarse con moléculas de selección apropiadas si el gen marcador seleccionable codifica una proteína que proporciona resistencia al antibiótico (es decir, G418 en el contexto de resistencia a la neomicina). Como es conocido por un experto en la materia, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las células que no han incorporado ningún marcador detectable morirán. Esto hace posible observar y ensayar la expresión de los vectores de expresión recombinante de la invención. Se apreciará asimismo que los marcadores seleccionables puedan introducirse en un vector independiente del ácido nucleico de interés.

Los vectores de expresión recombinante pueden contener asimismo genes que codifican un grupo de fusión que proporciona aumento de expresión de los polipéptidos de la invención; aumento de solubilidad de los polipéptidos de la invención; y/o ayudas en la purificación de una proteína recombinante diana actuando como un ligando en la purificación por afinidad. Por ejemplo, puede añadirse una secuencia de escisión proteolítica al polipéptido recombinante para permitir la separación del péptido o péptidos del polipéptido recombinante procedentes del grupo de fusión después de la purificación de la proteína de fusión.

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse también por síntesis química utilizando técnicas bien conocidas en la química de las proteínas tal como la síntesis en fase sólida (Merrifield (1964) *J. Am. Chem. Assoc.* 85:2149) o síntesis en solución homogénea (Methods of Organic Chemistry, E. Wansch (Ed.) vol. 15, partes I y II, Thieme, Stuttgart (1987)).

Las formas de realización adicionales de la invención contienen los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos descritos anteriormente. Como se define en la presente memoria, "ácido(s) nucleico(s)" contienen (pero no se limitan a) ácido(s) nucleico(s) vírico(s), plásmido(s), ADN bacteriano, ADN y ARN desnudos/libres. Los ácidos nucleicos contienen tanto formas monocatenarias como bicatenarias. Como tales, estos ácidos nucleicos comprenden las secuencias básicas aplicables que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente. Para fines de carácter definitivo, las "secuencias básicas aplicables que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente" comprenden además secuencias de ácido nucleico complementarias.

En una forma de realización de la invención, el ácido nucleico tiene la secuencia indicada por la SEC. ID. n°: 2 (Figura 1). En otras formas de realización de la invención, los ácidos nucleicos comprenden esta secuencia (es decir, la SEC. ID. n°: 2 (Figura 1)).

Como se manifestó anteriormente, la presente invención comprende asimismo las secuencias de ácido nucleico que son complementarias así como anticomplementarias con la secuencia indicada por la SEC. ID. n°: 2 y las variantes de la secuencia equivalente de la misma. Un experto en la materia puede determinar dichas secuencias de ácido nucleico complementarias o anticomplementarias. Asimismo forman parte de la invención las secuencias de ácido nucleico que se hibridan con una de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente en condiciones severas. "Condiciones severas" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los parámetros habituales en la técnica y dichos parámetros se exponen por ejemplo en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, *et al.*, eds., segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 o Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel, *et al.*, eds., John Wiley & Sons Inc., Nueva York. Un experto en la materia sería capaz de identificar homólogos de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de MAGE de la invención así como identificar las células y bancos para la expresión de dichas moléculas que se aíslan a continuación, seguido del aislamiento de la molécula de ácido nucleico pertinente y del secuenciado.

Obsérvese que las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria representan una forma de realización preferida de la invención. La invención comprende asimismo los ácidos nucleicos degenerados que se diferencian de las secuencias mencionadas anteriormente. Debido a la degeneración del código genético, las variaciones en la secuencia de ADN producirán la traducción de péptidos equivalentes. Se entiende por lo tanto que pueden hacerse numerosas selecciones de nucleótidos que conducirán a una secuencia capaz de dirigir la producción de los polipéptidos o de sus análogos funcionales de la presente invención. Como resultado, se incluyen sustituciones en el alcance de la invención.

El ácido nucleico vírico de la invención puede proceder de un virus de viruela o de otro virus tal como un adenovirus o alfavirus. Como tales, los ácidos nucleicos víricos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención se denominan para la exposición a continuación como un "vector vírico". Preferentemente el vector vírico es incapaz de integración en células animales del receptor. Los elementos para la expresión de dicho vector pueden incluir un activador adecuado para la expresión en células animales del receptor.

Se han descrito vectores de adenovirus y procedimientos para su construcción (p. ej. las patentes U.S. n° 5.994.132, n° 5.932.210, n° 6.057.158 y las solicitudes PCT publicadas WO 9817783, WO 9744475, WO 9961034, WO 9950292, WO 9927101, WO 9720575, WO 9640955 y WO 9630534).

Los vectores de alfavirus han sido también descritos en la técnica y pueden utilizarse en las formas de realización de la presente invención (p. ej. las patentes U.S. n° 5.792.462, n° 5.739.026, n° 5.843.723, n° 5.789.245 y las solicitudes PCT publicadas WO 9210578, WO 9527044, WO 9531565, WO 9815636), ya que presentan vectores de lentivirus (p. ej. las patentes U.S. n° 6.013.516, n° 5.994.136 y las solicitudes PCT publicadas WO 9817816, WO 9712622,

WO 9817815, WO 9839463, WO 9846083, WO 9915641, WO 9919501, WO 9930742, WO 9931251, WO 9851810, WO 0000600). Los vectores de poxvirus que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, vacunas y poxvirus del canario (tal como se describe en las patentes U.S. n° 5.364.773, n° 4.603.112, n° 5.762.938, n° 5.378.457, n° 5.494.807, n° 5.505.941, n° 5.756.103, n° 5.833.975 y n° 599.009).

Los vectores de poxvirus que comprenden un ácido nucleico que codifica polipéptidos de la invención pueden obtenerse por recombinación homóloga como es conocido por un experto en la materia. Como tal, el polinucleótido de la invención se inserta en el genoma vírico en condiciones apropiadas para la expresión en células de mamíferos (tal como se describe a continuación).

En una forma de realización de la invención, el vector de la vacuna de la viruela es ALVAC (1) o ALVAC (2) (los cuales se han obtenido del poxvirus del canario). ALVAC (1) (o ALVAC (2)) no se replican de manera productiva en anfitriones no aviares, una característica que se cree que mejora su perfil de seguridad. ALVAC (1) es un vector basado en el poxvirus del canario atenuado que era un derivado clonado en placa de la vacuna de la viruela del canario autorizada, Kanapox (Tartaglia *et al.* (1992) *Virology* 188:217; patentes U.S. n° 5.505.941, n° 5.756.103 y n° 5.833.975).

ALVAC (1) presenta algunas propiedades generales que son las mismas que algunas propiedades generales de Kanapox. Los virus recombinantes a base de ALVAC que expresan inmunógenos extrínsecos se ha demostrado que son eficaces como vectores de vacuna (Tartaglia *et al.*, en *AIDS Research Reviews* (vol. 3) Koff W., Wong-Staal F. y Kenedy R. C. (eds.), Marcel Dekker NY, págs. 361-378 (1993a); Tartaglia, J. *et al.* (1993b) *J. Virol.* 67:2370). Por ejemplo, ratones inmunizados con ALVAC (1) recombinante que expresan la glucoproteína del virus de la rabia se protegieron de la prueba por provocación letal con virus de la rabia (Tartaglia, J. *et al.*, (1992) *supra*) demostrando el potencial de ALVAC (1) como vector de vacuna. Recombinantes a base de ALVAC se ha demostrado que son eficaces en la prueba de provocación en perros con virus del moquillo canino (Taylor, J. *et al.* (1992) *Virology* 187:321) y virus de la rabia (Perkus, M. E. *et al.*, en *Combined Vaccines and Simultaneous Administration: Current Issues and Perspective*, Annals of the New York Academy of Sciences (1994)), en la prueba de provocación en gatos con virus de leucemia felina (Tartaglia, J. *et al.*, (1993b) *supra*) y en la prueba de provocación en caballos con el virus de la gripe equina (Taylor, J. *et al.*, en *Proceedings of the Third International Symposium on Avian Influenza*, Univ. de Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, págs. 331-335 (1993)).

ALVAC (2) es un vector de ALVAC de segunda generación en el que los elementos E3L y K3L de transcripción de la vacuna han sido insertados en el locus C6 (patente U.S. n° 5.990.091). El E3L codifica una proteína capaz de unirse específicamente a ARNds. El ORF de K3L presenta homología significativa con E1F-2. Dentro de ALVAC (2) el gen E3L está bajo el control de la transcripción de su activador natural, mientras que K3L ha sido colocado bajo el control del activador H6 precoz/tardío de la vacuna. Los genes E3L y K3L actúan para inhibir la actividad de PKR en las células infectadas con ALVAC (II), lo que permite el aumento del nivel y la persistencia de la expresión del gen extraño.

Los vectores víricos adicionales contienen poxvirus naturales restringidos al anfitrión. El virus avipox (FPV) es el virus prototípico del género Avipox de la familia Poxvirus.

La replicación de los virus avipox está limitada a las especies aviares (Matthews, R. E. F. (1982) *Intervirology* 17:42) y no existen descripciones en la bibliografía del virus avipox que produzca una infección productiva en cualquier especie no aviar incluyendo al hombre. Esta descripción del anfitrión proporciona una barrera de seguridad inherente a la transmisión del virus a otras especies y utiliza vectores a base del virus avipox en aplicaciones veterinarias y humanas como propuesta atractiva.

Se ha utilizado con ventaja FPV como vector que expresa inmunógenos procedentes de patógenos de aves de corral. La proteína hemoaglutinina de un virus de la gripe aviar virulento se expresó en un FPV recombinante. Después de la inoculación del recombinante en pollos y pavos, se provocó una respuesta inmunitaria que produjo protección contra una prueba de provocación del virus de la gripe virulento homólogo o heterólogo (Taylor, J. *et al.* (1988) *Vaccine* 6:504). También se han desarrollado los recombinantes de FPV que expresan las glucoproteínas de la superficie del virus de la enfermedad de Newcastle (Taylor, J. *et al.* (1990) *J. Virol.* 64:1441; Edbauer, C. *et al.* (1990) *Virology* 179:901); patente U.S. n° 5.766.599).

Una cepa de vacuna muy atenuada, denominada MVA, se ha utilizado también como vector para las vacunas a base de poxvirus. La utilización de MVA se describe en la patente U.S. n° 5.185.146. Otros vectores del poxvirus atenuados se han preparado por modificación genética para cepas naturales de vacunas. El vector NYVAC, por ejemplo, se obtiene por delección de virulencia específica y de los genes del intervalo del anfitrión de la cepa Copenhagen de vacuna (Tartaglia, J. *et al.* (1992), *supra*; patentes U.S. n° 5.364.773 y n° 5.494.807) y se ha demostrado que es útil como vector recombinante en la producción de una respuesta inmunitaria protectora contra los antígenos extraños expresados.

Los poxvirus recombinantes pueden construirse por un procedimiento conocido por los expertos en la materia (tal como se describió anteriormente para la vacuna y los virus avipox; patentes U.S. n° 4.769.330; n° 4.722.848; n° 4.603.112; n° 5.110.587 y n° 5.174.993).

Como tal, una forma de realización de la invención comprende un virus recombinante que comprende un virus en el que se inserta un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, produciendo dicho virus recombinante la expresión del polipéptido en una célula infectada. En otras formas de realización de la invención el virus recombinante se selecciona de entre el grupo constituido por adenovirus, alfavirus y poxvirus. Incluso en otras formas de realización, el virus recombinante es ALVAC. Todavía incluso en otra forma de realización de la invención, el virus recombinante es ALVAC(1) en el que se inserta el ácido nucleico de la Figura 1 (SEC. ID. n°: 2) que codifica el polipéptido de la Figura 2 (SEC. ID. n°: 1). Además, el ácido nucleico vírico recombinante de dicho virus recombinante en una forma de realización de la invención está más caracterizado porque está representado esquemáticamente en la Figura 3.

Se ha descrito el ADN bacteriano útil en las formas de realización de la invención y es conocido por los expertos en la materia. Estas bacterias incluyen, por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus*, bacilo de Calmette Guérin (BCG) y *Streptococcus*.

En formas de realización adicionales, pueden utilizarse bacterias vivas y/o atenuadas por sí mismas como vectores para ácidos nucleicos de la presente invención. Por ejemplo, pueden utilizarse cepas mutantes de *Vibrio cholerae* no tóxicas como vectores bacterianos en las formas de realización de la presente invención; como se describe en la patente U.S. n° 4.882.278 (que da a conocer una cepa en la que una cantidad sustancial de la secuencia de codificación de cada uno de los dos alelos *ctxA* se ha eliminado de modo que no se produce ninguna toxina de cólera operativa), documento WO 92/11354 (cepa en la que el locus *irgA* está inactivado por mutación; esta mutación puede combinarse en una única cepa con mutaciones de *ctxA*) y documento WO 94/1533 (mutante por delección que carece de las secuencias de ADN *ctxA* funcional y *attRS1*). Estas cepas pueden modificarse genéticamente para expresar los antígenos heterólogos, tal como se describe en el documento WO 94/19482.

Una dosis inmunógena eficaz de una cepa de *Vibrio cholerae* capaz de expresar unos polipéptidos codificados por una molécula de ADN de la invención puede contener, por ejemplo, entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 , preferentemente entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 bacterias viables en un volumen apropiado para la vía de administración seleccionada.

Las cepas de *Salmonella typhimurium* atenuadas, modificadas genéticamente para la expresión recombinante de antígenos heterólogos y su utilización como inmunógenos orales se describen, por ejemplo, en el documento WO 92/11361.

Como se indicó anteriormente, los expertos en la materia apreciarán fácilmente que otras cepas bacterianas útiles como fuentes de ADN y/o de vectores bacterianos en las formas de realización de la presente invención incluyen *Shigella flexneri*, *Streptococcus gordonii* y bacilo de Calmette Guérin (como se describe en los documentos WO 88/6626, WO 90/0594, WO 91/13157, WO 92/1796 y WO 92/21376). En las formas de realización con ADN bacteriano de la presente invención, puede insertarse un ácido nucleico de la invención en el genoma bacteriano, puede permanecer en estado libre o puede llevarse a cabo en un plásmido.

Las células que comprenden los ácidos nucleicos mencionados anteriormente que codifican los polipéptidos de la presente invención contienen más formas de realización de la invención. Estas células contienen cualquier célula potencial en la que puede introducirse y/o transfectarse un ácido nucleico de la presente invención. La selección del procedimiento para la introducción y/o transfección en las células depende de la naturaleza intrínseca del ácido nucleico (es decir, del virus recombinante, plásmido), como conoce un experto en la materia (por ejemplo, como se da a conocer en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel *et al.* (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., N.Y., U.S.A. (1998), cap. 9; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S.A. (1989), caps. 1, 2, 3 y 16).

Está bien documentado que las proteínas de clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) realizan una función inmunológica central en el enfoque de los linfocitos T del sistema inmunitario (es decir linfocitos T CD8+ y CD4+). Las proteínas MHC de clase I se expresan en casi todos los tipos de células nucleadas en todo el cuerpo humano; las moléculas MHC de clase II se expresan principalmente en las células que presentan el antígeno (APC; es decir fagocitos mononucleares, células dendríticas de Langerhans y linfocitos B). Estas clases distintas de moléculas de la superficie celular (es decir, de clase I y clase II) presentan péptidos/epítomos (procedentes del tratamiento intracelular de antígenos de proteínas) a linfocitos T (linfocitos T CD8+ y CD4+ respectivamente) iniciando de este modo las respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales. Generalmente, los epítomos/péptidos procedentes de aloantígenos, los antígenos tumorales o los virus se presentarán junto con las moléculas MHC de clase I; los antígenos/proteínas extracelulares se presentarán junto con las moléculas MHC de clase II. Sin embargo, en algunos contextos también pueden presentarse antígenos endógenos junto con moléculas MHC de clase II. [Estos principios inmunológicos generales están bien descritos en la técnica como, por ejemplo, en *Encyclopedia of Immunology* (2ª ed.), Peter J. Delves (ed.-in-Chief), Academic Press, San Diego, U.S.A., págs. 174-8, 191-8, 1108-13, 1690-709 (1998)].

Como tales, las formas de realización de la invención contienen las células en las que se ha introducido/transfectado un ácido nucleico de la invención, en el que dichas células expresan un polipéptido de la invención. En formas de realización adicionales, dichas células son capaces de unir los fragmentos de escisión (es decir epítomos/péptidos) del polipéptido. Incluso todavía en formas de realización adicionales, estos fragmentos de escisión son producidos por una proteasa.

Tal como se concibe en la presente memoria, las formas de realización de la invención pueden comprender asimismo las células en las que se ha introducido/transfectado un ácido nucleico de la invención en el que dichas células expresan también una molécula MHC HLA (es decir, de clase I y/o de clase II). En formas de realización adicionales, estas células son células que presentan el antígeno, seleccionadas posiblemente de entre el grupo constituido por fagocitos mononucleares, células dendríticas de Langerhans (“célula(s) dendrítica(s)”) y linfocitos B.

Las formas de realización adicionales de la presente invención contienen además composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de la invención mencionados anteriormente, ácidos nucleicos que codifican a éstos y/o virus recombinantes que comprenden dichos ácidos nucleicos para la administración a pacientes en forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*. “Forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*” significa una forma de la sustancia que ha de administrarse en la que cualquiera de los efectos tóxicos es superado por los efectos terapéuticos. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, o de una “cantidad eficaz”, se define como una cantidad eficaz a las dosis y durante los periodos de tiempo, necesarios para conseguir el resultado deseado de provocar una respuesta inmunitaria en un paciente humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia puede variar según los factores tales como el estado patológico/salud, edad, sexo y peso del receptor, y la capacidad inherente del polipéptido concreto, el ácido nucleico que codifica al mismo, o el virus recombinante para provocar una respuesta inmunitaria deseada. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas a diario o en intervalos periódicos, y/o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden prepararse por los métodos conocidos por sí mismos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a pacientes, de modo que una cantidad eficaz de la sustancia activa (es decir, de la composición) se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen vehículos adecuados, por ejemplo, en “Handbook of Pharmaceutical Additives” (recopilados por Michael e Irene Ash, Gower Publishing Limited, Aldershot, Inglaterra (1995)). Sobre esta base, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de las sustancias junto con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y pueden estar contenidas en soluciones tamponadas con un pH adecuado y/o ser isoosmóticas con los fluidos fisiológicos. A este respecto, puede hacerse referencia a la patente U.S. nº 5.843.456.

Los procedimientos de producción o provocación de una respuesta inmunitaria en un animal dirigida contra:

- el polipéptido de la invención, o
- un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido, o
- una proteína MAGE o un fragmento de la misma que comprende un epítipo del antígeno específico para MAGE, o
- células que expresan la proteína MAGE o fragmentos de la misma, el polipéptido de la invención o un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido, o
- células que unen dicha proteína MAGE o fragmentos de la misma, el polipéptido de la invención o un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido,
- que comprende la etapa de administrar a dicho animal un polipéptido de la invención, un ácido nucleico que codifica a éste, un virus recombinante que comprende dicho ácido nucleico, o una célula que comprende dicho ácido nucleico (o las composiciones mencionadas anteriormente) están también comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Las formas de realización adicionales de la presente invención abarcan los tratamientos del cáncer que comprenden los métodos mencionados anteriormente de producir o provocar respuestas inmunitarias en animales.

Como se define en la presente memoria, un polipéptido de la invención, un ácido nucleico que codifica a éste, un virus recombinante que comprende dicho ácido nucleico, o una célula que comprende dicho ácido nucleico y las composiciones de los mencionados anteriormente se denominan conjuntamente “agente(s) inmunizante(s)”, “agente(s)” o “inmunógeno(s)”

Como es conocido por un experto en la materia, un animal puede ser inmunizado con un polipéptido de la invención, un ácido nucleico que codifica a éste, un virus recombinante que comprende dicho ácido nucleico o una célula que comprende dicho ácido nucleico (o composiciones de los mencionados anteriormente) por cualquier vía convencional. Ésta puede incluir, por ejemplo, inmunización a través de una superficie de mucosa (p. ej., ocular, intranasal, oral, gástrica, pulmonar, intestinal, rectal, vaginal o el aparato urinario) o por vía parenteral (p. ej., subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal). Las vías preferidas dependen de la elección del inmunógeno (es decir del polipéptido frente al ácido nucleico, de la formulación de la composición, etc.). La administración puede seguirse en una sola dosis o repetidas a intervalos. La dosis apropiada depende de varios parámetros comprendidos por los especialistas expertos, tal como el propio inmunógeno (es decir, polipéptido frente a ácido nucleico) y más específicamente de subtipo), de la vía de administración y de la enfermedad del animal que va a ser vacunado (peso, edad y

similares). Como tales, las formas de realización de la presente invención comprenden procedimientos de producción de respuestas inmunitarias en animales que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un polipéptido de la invención, de ácido nucleico que codifica a éste, de virus recombinante que comprende dicho ácido nucleico o de las células que comprenden dicho ácido nucleico (o de las composiciones de los mencionados anteriormente).

Tal como se indica, los ácidos nucleicos (en particular los plásmidos y/o el ADN libre/desnudo y/o el ARN que codifican el polipéptido de la invención) pueden administrarse a un animal con el fin de producir/provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la patente U.S. nº 5.589.466; McDonnell y Askari, *NEJM* 334:42-45 (1996); Kowalczyk y Erti, *Cell Mol. Life Sci.* 55:751-770 (1999)). Típicamente, este ácido nucleico es una forma que puede replicarse en la célula del animal objetivo y que no puede integrarse en el genoma de dicho animal. La molécula de ADN/ARN que codifica el polipéptido está asimismo colocada típicamente bajo el control de un activador adecuado para la expresión en la célula del animal. El activador puede funcionar en cualquier parte o específicamente en el tejido. Ejemplos de activadores no específicos para el tejido incluyen el activador precoz del citomegalovirus (CMV) (descrito en la patente U.S. nº 4.168.062) y el activador del virus del sarcoma de Rous. El activador de desmina es específico del tejido y dirige la expresión en las células musculares. De forma más generalizada, se han descrito vectores útiles (a saber, en el documento WO 94/21797).

Para la administración de los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención, dicho ácido nucleico puede codificar un precursor o forma madura del polipéptido. Cuando codifica una forma de precursor, la forma de precursor puede ser homóloga o heteróloga. En este último caso, puede utilizarse una secuencia eucariótica principal, tal como la secuencia principal del factor plasminógeno de tipo tejido (tPA).

En la preparación de aspectos de la invención pueden utilizarse las técnicas habituales de biología molecular para la preparación y purificación de ácidos nucleicos bien conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, tal como se da a conocer en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel *et al.* (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., N.Y., U.S.A. (1998), caps. 1, 2 y 4; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S.A. (1989), caps. 1, 2, 3 y 7).

Para su utilización como inmunógeno, puede formularse un ácido nucleico de la invención según varios procedimientos conocidos por un experto en la materia. En primer lugar, puede utilizarse un ácido nucleico en la forma desnuda/libre, exenta de cualquier vehículo de administración (tales como los liposomas aniónicos, lípidos catiónicos, micropartículas, (p. ej., micropartículas de oro), agentes de precipitación (p. ej., fosfato cálcico) o cualquier otro agente que facilite la transfección. En este caso el ácido nucleico puede estar simplemente diluido en una solución fisiológicamente aceptable (tal como solución salina esterilizada o solución salina tamponada esterilizada) con o sin un portador. Cuando está presente, el portador preferentemente es isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico, y tiene una fuerza iónica relativamente baja (tal como la proporcionada por una solución de sacarosa (p. ej., una solución que contiene 20% de sacarosa)).

Alternativamente, un ácido nucleico puede estar asociado a agentes que ayudan a la absorción celular. Puede ser, a saber, (i) enriquecido con un agente químico que modifica la permeabilidad celular (tal como bupivacaína; véase, por ejemplo, el documento WO 94/16737), (ii) encapsulado dentro de liposomas o (iii) asociado con lípidos catiónicos o micropartículas de sílice, oro o tungsteno.

Los lípidos catiónicos son bien conocidos en la técnica y se utilizan normalmente para la administración génica. Dichos lípidos incluyen Lipofectina (conocida también como DOTMA (cloruro de N-[1-2,3-dioleiloxy]propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOTAP (1,2-bis(oleiloxy)-3-(trimetilamonio) propano), DDAB (bromuro de dimetildioctadecilamonio), DOGS (dioctadecilaminoglicilespermina) y derivados de colesterol tales como DC-Col (3-beta-(N-(N',N'-dimetil aminometano)-carbamoíl) colesterol). Una descripción de estos lípidos catiónicos puede encontrarse en las patentes EP 187.702, WO 90/11092, patente US nº 5.283.185, WO 91/15501, WO 95/26356 y en la patente US nº 5.527.928. Para la administración génica se utilizan preferentemente lípidos catiónicos en asociación con un lípido neutro tal como DOPE (dioleíl fosfatidil etanolamina), como se describe, por ejemplo, en el documento WO 90/11092.

Otros compuestos que facilitan la transfección pueden añadirse a la formulación que contiene liposomas catiónicos. Un número de ellos se describe, por ejemplo, en los documentos WO 93/18759, WO 93/19768, WO 94/25608 y WO 95/2397. Éstos incluyen, a saber, derivados de espermina útiles para facilitar el transporte del ADN a través de la membrana nuclear (véase, por ejemplo, el documento WO 93/18759) y los compuestos permeabilizadores de la membrana tales como GALA, Gramicidina S y sales biliares catiónicas (véase, por ejemplo, el documento WO 93/19768).

Pueden utilizarse también micropartículas de oro o tungsteno para la administración génica (tal como se describe en los documentos WO 91/359 y WO 93/17706). En este caso, los polinucleótidos recubiertos de micropartículas pueden inyectarse por vía intradérmica o por vías intraepidérmicas utilizando un dispositivo de inyección sin aguja ("pistola génica"), tales como los descritos, por ejemplo, en la patente U.S. nº 4.945.050, patente U.S. nº 5.015.580 y WO 94/24263.

Los liposomas aniónicos y neutros son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Liposomes: A Practical Approach* RPC New Ed, IRL Press (1990), para una descripción detallada de los procedimientos para preparar liposomas) y son útiles para la administración de un gran intervalo de productos, incluyendo los polinucleótidos.

Como es bien conocido por los expertos en la materia, la capacidad de un agente para producir/provocar una respuesta inmunitaria pueden mejorarse si, independientemente de la formulación de la administración (a saber, virus recombinante, ácido nucleico, polipéptido), dicho agente se administra conjuntamente con un adyuvante. Los adyuvantes se describen y exponen en "Vaccine Design the Subunit Adjuvant Approach" (editado por Powell y Newman, Plenum Press, Nueva York, U.S.A., págs. 61-79 y 141-228 (1995)). Los adyuvantes potencian típicamente la inmunogenicidad de un inmunógeno pero no son necesariamente inmunógenos en y por sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el inmunógeno localmente cerca del sitio de administración para producir un efecto prolongado que facilita una liberación lenta y prolongada del agente inmunizante a las células del sistema inmunitario. Los adyuvantes pueden también atraer las células del sistema inmunitario hasta un compuesto de administración lenta inmunógeno y estimular dichas células para provocar respuestas inmunitarias. Como tales, las formas de realización de la presente invención comprenden composiciones que comprenden además adyuvantes.

Las características deseables de los adyuvantes ideales incluyen:

- falta de toxicidad;
- capacidad para estimular una respuesta inmunitaria de larga duración;
- sencillez de preparación y estabilidad al almacenamiento a largo plazo;
- capacidad para provocar respuestas tanto celulares como hormonales a antígenos administrados por varias vías, si se requiere;
- sinergia con otros adyuvantes;
- capacidad de interactuar selectivamente con poblaciones de células presentadoras de antígeno (APC);
- capacidad para producir específicamente respuestas inmunitarias específicas para células T_H1 o T_H2 apropiadas; y
- capacidad para aumentar selectivamente los niveles de isótopo del anticuerpo apropiado (por ejemplo, IgA) contra antígenos/inmunógenos.

Sin embargo, muchos adyuvantes son tóxicos y pueden producir efectos secundarios indeseables, haciéndoles inadecuados de este modo para su utilización en seres humanos y en muchos animales. Por ejemplo, algunos adyuvantes pueden producir granulomas, inflamaciones agudas y crónicas (a saber el adyuvante completo de Freund (FCA)), citólisis (a saber saponinas y polímeros plurónicos) y pirogenicidad, artritis y uveítis anterior (a saber dipéptido de muramilo (MDP) y lipopolisacárido (LPS)). De hecho, solamente el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (normalmente denominado vulgarmente alúmina) se utilizan de manera rutinaria como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La eficacia de la alúmina para aumentar las respuestas del anticuerpo a las vacunas contra la difteria y el tétanos está bien demostrada. De todas formas, esto tiene limitaciones. Por ejemplo, la alúmina es eficaz para la vacunación contra la gripe e incongruentemente provoca una respuesta inmunitaria mediada por las células con otros inmunógenos. Los anticuerpos provocados por antígenos asistidos con alúmina son principalmente del isotipo IgG1 en el ratón, que pueden no ser óptimos para la protección en los contextos de la vacunación.

Los adyuvantes pueden caracterizarse como "intrínsecos" o "extrínsecos". Los adyuvantes intrínsecos (tales como los lipopolisacáridos) son componentes integrales y normales de los agentes que en sí mismos se utilizan como vacunas (es decir bacterias inactivas o atenuadas). Los adyuvantes extrínsecos son típicamente inmunomoduladores no integrales generalmente unidos a antígenos de manera no covalente y se formulan para potenciar la respuesta inmunitaria del anfitrión.

Se ha descrito una variedad de potentes adyuvantes extrínsecos. Éstos incluyen (pero no se limitan a) saponinas acomplexadas con antígenos de las proteínas de la membrana (complejos estimulantes inmunitarios), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias inactivadas y aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos tales como dipéptido muramilo (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A y liposomas.

La utilización de saponinas por sí mismas como adyuvantes es también bien conocida (Lacaille-Dubois, M. y Wagner, H. (1996) *Phytomedicine* 2:363). Por ejemplo, Qui1 A (procedente de la corteza del árbol sudamericano Quillaza Saponaria Molina) y las fracciones del mismo han sido extensamente descritas (a saber, patente U.S. n° 5.057.540; Kensil, C. R. (1996) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 12:1; y patente europea EP 362279). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Qui1 A) han sido descritas como potentes adyuvantes generalizados (patente U.S. n° 5.057.540; patente europea EP 362279). En estas referencias también está descrita la utilización de QS7 (una fracción de Qui1-A no hemolítica) que actúa como un potente adyuvante para las vacunas generales. La utilización de QS21 se describe con mayor detalle en Kensil *et al.* ((1991) *J. Immunol.* 146:431). Las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina son también conocidas (documento WO 9910008). Los sistemas de adyuvante en partículas que comprenden fracciones de Qui1 A (tales como QS21 y QS7) se describen en los documentos WO 9633739 y WO 9611711.

Otro adyuvante/inmunoestimulante preferido es un oligonucleótido inmunoestimulante que contiene dinucleóticos CpG no metilados ("CpG"). CpG es una abreviatura para los motivos de dinucleótido citosina-guanosina presentes en el ADN. CpG es conocido en la técnica por ser un adyuvante cuando se administra tanto por vía general como por la mucosa (documento WO 9602555; patente europea EP 468520; Davies *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:87; McCluskie y Davis (1998) *J. Immunol.* 161:4463). En numerosos estudios, se ha demostrado también que los oligonucleótidos sintéticos derivados de las secuencias del gen BCG son capaces de producir efectos inmunoestimulantes (tanto *in vitro* como *in vivo*; Krieg, (1995) *Nature* 374:546). El análisis detallado de las secuencias oligonucleotídicas inmunoestimulantes ha demostrado que el motivo CG puede estar en un determinado contexto de secuencia, y que dichas secuencias son comunes en el ADN bacteriano pero son raras en el ADN de vertebrados. (Por ejemplo, la secuencia inmunoestimulante es con frecuencia: purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina, en la que el motivo CG no está metilado; sin embargo otras secuencias con CpG no metiladas son conocidas por ser inmunoestimulantes y como tales pueden también utilizarse en la presente invención).

Una variedad de otros adyuvantes son dados a conocer en la técnica, y como tales están comprendidos en las formas de realización de la presente invención. La patente U.S. n° 4.855.283 concedida a Lockhoff *et al.* da a conocer análogos de glicolípido y su utilización como adyuvantes. Estos incluyen N-glucosilamidas, N-glucosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el resto de azúcar por un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes. Además, Lockhoff *et al.* ((1991) *Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1611) han descrito que los análogos de N-glucolípido que presentan similitudes estructurales con los glucolípidos naturales (tales como los glucosfolípidos y glucoglicerolípidos) son también capaces de provocar respuestas inmunitarias potentes tanto en la vacuna contra el virus del herpes simple y la vacuna contra el virus de la pseudorrabia.

La patente U.S. n° 4.258.029 concedida a Moloney da a conocer que las funciones del hidrocloreto de octadecil tirosina (OTH) como adyuvante cuando se acompleja con vacuna antitetánica y vacuna antivírica contra la poliomeilitis tipo I, II y III inactivada con formalina. Nixon-George *et al.* ((1990) *J. Immunol.* 14:4798) han descrito también que los ésteres de octadecilo de aminoácidos aromáticos acomplejados con un antígeno de superficie de la hepatitis B recombinante potenció las respuestas inmunitarias del anfitrión contra el virus de la hepatitis B.

Los compuestos adyuvantes pueden seleccionarse también de entre los polímeros del ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros del anhídrido maleico y del derivado de alqueno. Los compuestos adyuvantes son los polímeros del ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con éteres de polialqueno o azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (Pharmeuropa vol. 8, n° 2, junio 1996). Preferentemente, se prepara en agua destilada una solución de adyuvante según la invención, especialmente de carbómero, preferentemente en presencia de cloruro sódico, obteniéndose la solución a pH ácido. Esta solución madre se diluye añadiéndola a la cantidad deseada (para obtener la concentración final deseada), o una parte sustancial de la misma, de agua con NaCl, preferentemente solución salina fisiológica (9 g/l de NaCl) todo a la vez en varias porciones con neutralización simultánea o posterior (pH 7,3 a 7,4), preferentemente con NaOH. Esta solución a pH fisiológico se utilizará tal cual para mezclarla con el agente inmunizante; siendo adecuada dicha mezcla para el almacenamiento en forma liofilizada, líquida o congelada.

Los expertos en la materia pueden hacer referencia además a la patente U.S. n° 2.909.462 que describe adyuvantes que comprenden polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene por lo menos 3 grupos hidroxilo (preferentemente no más de 8), estando sustituidos los átomos de hidrógeno de por lo menos tres hidroxilos por radicales alifáticos insaturados que tienen por lo menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono (p. ej. vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados). Los propios radicales insaturados pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos comercializados bajo la denominación Carbopol (BF Goodrich, Ohio, EEUU) son particularmente apropiados. Éstos se reticulan con alilsacarosa o con alilpentaeritritol. Entre ellos, puede mencionarse Carbopol (por ejemplo, 974P, 934P y 971P). Entre los copolímeros de anhídrido maleico y del derivado de alqueno, los copolímeros EMA (Monsanto; que son copolímeros del anhídrido maleico y del etileno, lineales o reticulados, (por ejemplo reticulados con éter divinílico)) son los preferidos. Para una descripción adicional de estos productos químicos puede hacerse referencia a J. Fields *et al.* ((1960) *Nature* 186: 778).

En aspectos adicionales de la presente invención, adyuvantes útiles para la administración parenteral del agente inmunizante incluyen los compuestos de aluminio (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato hidróxido de aluminio; pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión soluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos modificados catiónica o aniónicamente, o polifosfacenos). El antígeno puede precipitarse con el compuesto de aluminio o adsorberse en el mismo, según los protocolos normalizados bien conocidos por los expertos en la materia.

Otros adyuvantes comprendidos en las formas de realización de la presente invención incluyen el lípido A (en particular monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL). 3D-MPL es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Químicamente se suministra con frecuencia como una mezcla de monofosforil lípido A 3-de-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Puede prepararse por los métodos dados a conocer en el documento GB 2122204B. Una forma preferida de 3D-MPL está en forma de una formulación en partículas que tiene un tamaño de partícula inferior a 0,2 μ m de diámetro (patente europea EP 689454).

Los adyuvantes para inmunización de las mucosas pueden incluir toxinas bacterianas (p. ej. toxina del cólera (CT), toxina inestable térmicamente de *E. coli* (LT), la toxina A de *Clostridium difficile* y la toxina de la tos ferina (PT) o combinaciones, subunidades, toxoides o mutantes de las mismas). Por ejemplo, puede ser útil una preparación purificada de la subunidad B natural de la toxina del cólera (CTB). Los fragmentos, homólogos, derivados y fusión a alguna de estas toxinas son también adecuadas, con tal que conserven actividad del adyuvante. Puede utilizarse un mutante con toxicidad reducida. Se han descrito mutantes (p. ej., en el documento WO 95/17211 (mutante CT Arg-7-Lys), documento WO 96/6627 (mutante LT Arg-192-Gly) y documento WO 95/34323 (mutante PT Arg-9-Lys y Glu-129-Gly)). Los mutantes LT adicionales incluyen, por ejemplo los mutantes Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp y Glu-112-Asp. Otros adyuvantes tales como monofosforil lípido A (MPLA) bacterianos de varias fuentes (p. ej., *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri*) pueden también utilizarse en la administración a las mucosas de agentes inmunizantes.

Los adyuvantes útiles para la inmunización tanto de las mucosas como parenteral incluyen polifosfaceno (por ejemplo, en el documento WO 95/2415), DC-col (3 b-(N-(N',N'-dimetil aminometano)-carbamoíl) colesterol (por ejemplo, patente U.S. n° 5.283.185 y documento WO 96/14831) y QS-21 (por ejemplo, documento WO 88/9336).

Pueden formularse adyuvantes/inmunoestimulantes como los descritos en la presente memoria junto con portadores, tales como por ejemplo liposomas, emulsiones aceite en agua y/o sales metálicas incluyendo las sales de aluminio (tal como el hidróxido de aluminio). Por ejemplo, puede formularse 3D-MPL con hidróxido de aluminio (como se expone en la patente EP 689454) o emulsiones de aceite en agua (como se expone en el documento WO 9517210); QS21 puede formularse de manera ventajosa con liposomas que contienen colesterol (como se expone en el documento WO 9633739), en emulsiones de aceite en agua (como se expone en el documento WO 9517210) o alúmina (como se expone en el documento WO 9815287). Cuando se formula en vacunas, los oligonucleótidos inmunoestimulantes (a saber, CpGs) se administran generalmente en solución libre junto con antígeno libre (como se expone en el documento WO 9602555; McCluskie y Davis (1998) *Supra*), conjugados covalentemente con un antígeno (como se expone en el documento WO 9816247) o formulado con un portador tal como hidróxido de aluminio o alúmina (como se expone en Davies *et al. Supra*; Brazolot-Milan *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:15553).

Las combinaciones de adyuvantes/inmunoestimulantes están asimismo comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A y derivado de saponina (tal como se describe en los documentos WO 9400153, WO 9517210, WO 9633739, WO 9856414, WO 9912565, WO 9911214) pueden utilizarse, o más específicamente la combinación de QS21 y 3D-MPL (como se describe en el documento WO 9400153). Una combinación de un oligonucleótido inmunoestimulante y una saponina (tal como QS21) o una combinación de monofosforil lípido A (preferentemente 3D-MPL) en combinación con una sal de aluminio forma asimismo un potente adyuvante para su utilización en la presente invención.

Ejemplos

La expresión anterior describe generalmente la presente invención. Una comprensión más completa puede obtenerse con relación a los siguientes Ejemplos específicos. Estos Ejemplos se describen únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención. Aunque se han empleado en la presente memoria términos específicos, dichos términos se proponen en sentido descriptivo y no con propósitos de limitación.

Los procedimientos de genética molecular, bioquímica de proteínas e inmunología utilizados pero no descritos explícitamente en esta publicación y estos Ejemplos están descritos ampliamente en la bibliografía científica y están dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

Ejemplo 1

Generación del montaje recombinante ALVAC- Minigén MAGE 1/3 (vCP1469A)

Sumario

Para generar el Minigén recombinante ALVAC-MAGE 1/3 denominado vCP1469A, un ácido nucleico que contiene una casete de expresión activada por virus de la viruela para un Minigén constituido por epítopos de MAGE 1 y MAGE 3 separados por un supuesto punto de escisión de proteasa se subclonó en un plásmido donante de ALVAC. Esta casete de expresión se insertó posteriormente en el punto de inserción C6 en el genoma de ALVAC(1) por recombinación *in vitro*.

No se ha atribuido todavía ninguna función al polipéptido codificado por C6 de ALVAC, ni el marco de lectura abierto del aminoácido deducido codificado en esta zona comparte homología significativa con cualquier introducción en las bases de datos de la secuencia de la proteína existente. En la Figura 3 se muestra un esquema del perfil de la cartografía de restricción de *Xho I* del montaje recombinante ALVAC(1)-Minigén MAGE 1/3 denominado vCP1469A.

Generación del recombinante de ALVAC vCP1469A

Se utilizó el plásmido pCDSR α (que contiene una secuencia que codifica un fragmento de MAGE 1 que contiene los aminoácidos 149 a 181) como plantilla en una reacción PCR con los cebadores siguientes:

ES 2 276 788 T3

MAGE01 (5'>CCC TCG CGA TAT CCG TTA AGT TTG TAT CGT AAT GGA GTC CTT GCA GCT GGT C<3') y

MAGE02 (5'>GGG CTC GAG CTA GTA CAA GTG GCC GAT GGG GTC CAG TTC TTT ACG CTT ATT GCC ATC ATA GGA GAG ACC TAG<3').

(Este último cebador (es decir, MAGE02) comprende una secuencia complementaria de ácido nucleico para el epítipo del antígeno específico para MAGE3, la secuencia de escisión proteolítica y los 6 aminoácidos terminales en el extremo carboxilo del fragmento indicado anteriormente de MAGE 1).

El fragmento de PCR de 180 bp resultante contenía el extremo 3' de un activador H6 (que se origina a partir del plásmido pCDSRα) unido a un gen de fusión MAGE 1/3. El gen de fusión MAGE 1/3 comprende el epítipo del antígeno específico para MAGE-1 (situado dentro del fragmento de la proteína MAGE-1 constituido por los aminoácidos 149 a 181), una secuencia de escisión de proteasa modificada genéticamente y el epítipo del antígeno específico para MAGE-3 (aminoácidos 161 a 169 de MAGE-3; la secuencia de estos dos últimos proporcionada por el cebador MAGE02 (tal como se describió anteriormente)). Este fragmento se digirió con *EcoR5* y *Xho I* y se ligó con *EcoR5/Xho I*/plásmido pC6H6B7 digerido (este último plásmido contiene una secuencia de codificación activada por H6 irrelevante en un plásmido donante de C6). El plásmido donante de C6 resultante (denominado pMAGE1/3-1) contiene un activador H6 regenerado unido al Minigén MAGE 1/3.

El análisis de la secuencia del ADN puso de manifiesto una sustitución de G por C en la posición 118 del fragmento. Para corregir esta sustitución del nucleótido, se utilizó como plantilla pMAGE 1/3-1 para la ampliación por PCR que utiliza los cebadores **MAGE03** (5'>ATC GCG ATA TCC GTT AAG TTT G<3') y **MAGE04** (5'>GGG CTC GAG CTA GTA CAA GTG GCC GAT GGG GTC CAC TTC TTT ACG CTT ATT GCC<3'). El fragmento de 180 bp resultante que contiene el Minigén (3') H6/MAGE-1/3 con la posición 118 corregida se digirió con *EcoR5* y *Xho I* y se ligó posteriormente con el vector pMAGE 1/3-1 digerido con *EcoR5/Xho I*. El plásmido donante de C6 resultante (denominado pC6MAGE 1/3 CTL) que contenía el activador H6 regenerado se ligó al Minigén MAGE 1/3 corregido.

La recombinación se realizó entre el plásmido donante pC6MAGE 1/3 CTL y ALVAC(1) rescatando el virus utilizando los procedimientos descritos en la técnica y conocidos por los expertos en la materia (a saber patentes U.S. n° 4769330, n° 4722848, n° 4603112, n° 5174993, n° 5.110.587). El virus recombinante resultante (denominado vCP1469A) comprende una secuencia de Minigén MAGE 1/3 humana activada por la vacuna H6 en el locus C6 de ALVAC(1). Se caracteriza porque comprende la inserción del ácido nucleico cuya secuencia está representada en la Figura 1 (SEC. ID. n°: 2) que codifica el polipéptido representado en la Figura 2 (SEC. ID. n°: 1) y por el perfil de la cartografía de restricción de *Xho I* representado en la Figura 3.

Verificación de la inserción

Se aisló el ADN genómico vírico de las células infectadas con vCP1469A siguiendo los procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, tal como se da a conocer en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel *et al.* (eds.), John Wiley and Sons, Inc., N.Y., U.S.A. (1998); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S.A. (1989)). El ADN genómico se digirió con la endonucleasa de restricción *Xho I*. Los fragmentos de ADN resultantes se fraccionaron por electroforesis mediante un gel de agarosa y se observaron por tinción con bromuro de etidio. La inserción de la casete de expresión del Minigén MAGE 1/3 en el locus C6 se confirmó (véase la Figura 3 para una representación esquemática del perfil de la cartografía de restricción).

Ejemplo 2

Presentación de los epítipos del antígeno específico para MAGE individuales del Minigén MAGE 1/3 en células diana adecuadas

Se ha analizado la capacidad del virus recombinante del Minigén ALVAC-MAGE 1/3 (a saber vCP1469A) para expresar y presentar de manera apropiada los epítipos del antígeno específico para MAGE-1 y MAGE-3 en células diana utilizando un sistema de análisis *in vitro*.

Se aislaron células dendríticas humanas (DC) de células mononucleares de sangre periférica mediante el cultivo de células no adherentes durante 8 días en presencia de GM-CSF e IL4. Se recogieron e incubaron las células durante 6 horas con virus recombinante (vCP1469A) a varias multiplicidades de infección (MOI; comprendidas entre 0,9 y 60). Las células infectadas se lavaron y se analizó posteriormente su capacidad para estimular la liberación de IFN-gamma por el clon MZ2-CTL 82/30 de CTL (específico para MAGE 1, restringido para HLA-A1) o MZ2-CTL 20/38 (específico para MAGE 3, restringido para HLA-A1).

Como se representa en la Figura 4, las células dendríticas infectadas fueron capaces de estimular una producción significativa de IFN-gamma por ambos epítipos de antígeno específicos para MAGE-1 y MAGE-3. Las células dendríticas no infectadas no estimularon la producción de IFN-gamma detectable.

Ejemplo 3

Presentación del epítipo del antígeno específico para MAGE-1 procedente del Minigén MAGE 1/3 en asociación con ambas moléculas MHC HLA-A1 y HLA-B35

Se infectaron células dendríticas (DC) de un donante de HLA-A1 y B35 con tres virus recombinantes de ALVAC diferentes. El primer virus contenía el Minigén MAGE 1/3 (es decir vCP1469A); el segundo contenía la secuencia de codificación de MAGE-1 (denominada MAGE-A1); el tercero contenía la secuencia de codificación de β -galactosidasa (denominada β gal; referencia negativa). Las DC se distribuyeron en micropocillos (10^4 células por pocillo), se infectaron a varias multiplicidades de infección (MOI) durante 2 horas y posteriormente se lavaron. Las líneas celulares de melanoma MZ2-MEL-43 (HLA-A1⁺, HLA-B35⁻, MAGE-1⁺) y MI13443-MEL (HLA-A1⁺, HLA-B35⁺, MAGE-1⁺) se utilizaron como células diana de referencia positiva. Trescientas células del clon MZ2-CTL 82/30 de CTL (dirigidas contra el epítipo MAGE-1 presentado por HLA-A1) o CTL 7 (dirigido contra el epítipo de MAGE-1 presentado por HLA-B35) se añadieron a las DC o a las células diana de referencia positiva. Después de 20 horas, se midió por ELISA la IFN- γ producida por cada CTL (indicador de una interacción entre las CTL y las células diana).

Como se describe en la Figura 5, las DC infectadas estimularon eficazmente ambas CTL relevantes. El reconocimiento del epítipo por CTL 7 fue restringido por las moléculas HLA-B35; el reconocimiento del epítipo por MZ2-CTL 82/30 fue restringido por HLA-A1. Estos resultados indican que el epítipo del antígeno específico para MAGE de vCP1469A es presentado junto con ambos HLA-A1 y HLA-B35.

Ejemplo 4

Presentación del epítipo del antígeno específico para MAGE-3 procedente del Minigén MAGE 1/3 en asociación con las moléculas MHC y HLA-B35

Se infectaron células dendríticas (DC) de un donante de B35 con dos virus recombinantes de ALVAC diferentes. El primer virus contenía el Minigén MAGE 1/3 (es decir vCP1469A); el segundo contenía la secuencia de codificación de β -galactosidasa (denominada β gal; referencia negativa). Las DC se distribuyeron en micropocillos (10^4 células por pocillo), se infectaron a varias multiplicidades de infección (MOI) durante 2 horas y posteriormente se lavaron. La línea celular de melanoma MI13443-MEL (HLA-A1⁺, HLA-B35⁺, MAGE-1⁺) se utilizó como fuente de células diana de referencia positiva. Trescientas células del clon 41 de CTL (dirigidas contra el epítipo MAGE-3 presentado por HLA-B35) se añadieron a las DC o a las células diana de referencia positiva. Después de 20 horas, se midió por ELISA la IFN- γ producida por cada CTL (indicador de una interacción entre las CTL y las células diana).

Estos resultados indican que el epítipo del antígeno específico para MAGE-3 de vCP1469A es presentado junto con HLA-B35.

Ejemplo 5

Generación de una respuesta clínica en un ser humano con melanoma en respuesta a la administración de un Minigén recombinante de ALVAC-MAGE 1/3 (vCP1469A)

La administración del Minigén recombinante de ALVAC(1)-MAGE 1/3 (vCP1469A) a un paciente con melanoma (es decir, metástasis múltiple cutánea en tránsito de la pierna derecha) comprendía una metodología “refuerzo por cebado”.

El “cebado” implicaba 4 inyecciones sucesivas del recombinante ALVAC mencionado anteriormente a intervalos de 3 semanas; el “refuerzo” implicaba 3 inyecciones sucesivas de péptidos del epítipo del antígeno específicos para MAGE 1 y 3 (es decir EADPTGHSY y EVDPIGHLHY respectivamente) a intervalos de 3 semanas comenzando 3 semanas después de la última inyección con recombinante ALVAC.

Respecto a las inyecciones de recombinante ALVAC (es decir, el cebado), 1 ml de recombinante ALVAC (CCID₅₀ de $10^{7,0b}$) se dividió entre 4 puntos de inyección, 0,4 ml se inyectaron por vía subcutánea en los puntos 1 y 3, y 0,1 ml se inyectaron por vía intradérmica en los puntos 2 y 4 (en la región deltoide o aspecto anterior de los muslos). No se administró ninguna inyección en las piernas en las que se extirparon quirúrgicamente y/o se irradiaron los ganglios linfáticos que drenan, o en las piernas en las que se conocía que los ganglios linfáticos que drenan contenían metástasis.

Respecto a las inyecciones de péptido del epítipo del antígeno específico para MAGE (es decir refuerzo), 0,5 ml de cada péptido se dividió entre 2 puntos de inyección independientes, 0,4 ml se inyectaron por vía subcutánea en los puntos 1 y 3, y 0,1 ml se inyectaron por vía intradérmica en los puntos 2 y 4 (es decir, el régimen de refuerzo con los 2 péptidos consistió en 4 puntos de inyección en el deltoides o en el aspecto anterior del muslo).

El receptor de las inyecciones se observó de manera rutinaria durante un periodo de 120 minutos inmediatamente después de cualquier inyección. Durante estos periodos de observación, se midieron cada 30 minutos la presión sanguínea arterial (sistólica y diastólica), la frecuencia cardíaca y la temperatura oral del cuerpo. Se evaluó en el receptor cada tres semanas (con respecto a los antecedentes, examen clínico y pruebas biológicas básicas). Se tomaron fotografías a color de todas las lesiones cutáneas y/o superficiales. Al comienzo de la prueba clínica, el receptor de las

ES 2 276 788 T3

inyecciones manifestaba melanoma en forma de metástasis cutánea múltiple en tránsito de la pierna derecha. Después de recibir cuatro series de inyecciones con el recombinante ALVAC y 2 series de inyecciones con los péptidos MAGE, se observó una regresión objetiva de la metástasis cutánea. Una minoría de los módulos demostró alguna regresión durante la serie inicial de inyecciones de “cebado” con el recombinante ALVAC. No han aparecido nuevas lesiones, y se han reabsorbido las lesiones sangrantes. La mayoría de las lesiones disminuyó de tamaño (la mayor parte en profundidad); las lesiones mayores se volvieron necróticas y se contrajeron gradualmente. Se desarrolló una dilatación del ganglio linfático inguinal derecho. Un examen de dicho ganglio linfático no puso de manifiesto la presencia de células de melanoma.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido inmunógeno que comprende un fragmento de una proteína MAGE-1 que comprende un primer epítipo del antígeno específico para MAGE que presenta la secuencia EADPTGHSY y un fragmento de una proteína MAGE-3 que comprende un segundo epítipo del antígeno específico para MAGE que presenta la secuencia EVDPIGHLY.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que el primer epítipo del antígeno específico para MAGE y el segundo epítipo del antígeno específico para MAGE están unidos.

3. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que una secuencia enlazadora de aminoácidos se une a los primer y segundo epítipos del antígeno específico para MAGE.

4. Polipéptido según la reivindicación 3, en el que la secuencia enlazadora de aminoácidos comprende un sitio de escisión de proteasa.

5. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº: 1.

6. Polipéptido según la reivindicación 1, que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. nº: 1.

7. Ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Ácido nucleico según la reivindicación 7, que codifica el polipéptido de la reivindicación 6.

9. Ácido nucleico según la reivindicación 7, en el que la secuencia que codifica el polipéptido presenta la secuencia de SEC. ID. nº: 2.

10. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el ácido nucleico se selecciona de entre el grupo constituido por ácido nucleico vírico, plásmidos, ADN bacteriano, ADN y ARN desnudos/libres.

11. Ácido nucleico vírico según la reivindicación 10, en el que el virus se selecciona de entre el grupo constituido por adenovirus, alfavirus y poxvirus.

12. Poxvirus según la reivindicación 11, seleccionado de entre el grupo constituido por vacuna, viruela aviar y avipox.

13. Poxvirus según la reivindicación 11, seleccionado de entre el grupo constituido por TROVAC, ALVAC, NYVAC Y MVA.

14. Poxvirus según la reivindicación 11, en el que el poxvirus es ALVAC.

15. Célula que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en la que la célula expresa el polipéptido.

16. Célula según la reivindicación 15, en la que la célula une los fragmentos de la escisión del polipéptido.

17. Célula según la reivindicación 16, en la que una proteasa produce los fragmentos de escisión.

18. Célula según la reivindicación 15, en la que la célula expresa además una molécula MHC HLA de clase I.

19. Célula según la reivindicación 15, en la que la célula es una célula que presenta al antígeno.

20. Célula según la reivindicación 19, en la que la célula es una célula dendrítica.

21. Virus recombinante que comprende un virus en el que se inserta un ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, produciendo el virus recombinante la expresión del polipéptido en una célula infectada.

22. Virus recombinante en el que se inserta un ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células infectadas con dicho virus recombinante son capaces de provocar una respuesta inmunitaria.

23. Virus recombinante según la reivindicación 22, en el que la respuesta inmunitaria se dirige contra un elemento seleccionado de entre el grupo constituido por:

ES 2 276 788 T3

el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;

un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido;

una proteína MAGE o un fragmento de la misma que comprende un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido;

células que expresan la proteína MAGE o fragmentos de la misma, el polipéptido, un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido; y

células que unen dicha proteína MAGE o fragmentos de la misma, el polipéptido un epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido.

24. Virus recombinante según la reivindicación 22 ó 23, seleccionado de entre el grupo constituido por adenovirus, alfavirus y poxvirus.

25. Virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que el virus es ALVAC.

26. Composición farmacéutica que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, o el virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25 y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

27. Composición según la reivindicación 26, que comprende además un adyuvante.

28. Utilización de un virus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para la preparación de un medicamento destinado a producir una respuesta inmunitaria en un animal.

29. Utilización de un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, para la preparación de un medicamento destinado a producir una respuesta inmunitaria en un animal.

30. Utilización de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento destinado a producir una respuesta inmunitaria en un animal.

31. Utilización de una célula según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, para la preparación de un medicamento destinado a producir una respuesta inmunitaria en un animal.

32. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31 en la que la respuesta inmunitaria se dirige contra un elemento seleccionado de entre el grupo constituido por:

un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,

un epítipo del antígeno específico para MAGE de dicho polipéptido,

una proteína MAGE o un fragmento de la misma que comprende un epítipo del antígeno específico para MAGE de dicho polipéptido,

células que expresan dicha proteína MAGE o un fragmento de la misma, polipéptido, epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido; y

células que unen dicha proteína MAGE o fragmentos de la misma, polipéptido, epítipo del antígeno específico para MAGE del polipéptido.

33. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

34. Utilización de un polipéptido inmunógeno según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

35. Utilización según la reivindicación 34, en la que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. nº: 1.

36. Utilización de una secuencia de ácido nucleico aislado, purificado o recombinante que presenta la secuencia de SEC. ID. nº: 2, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

37. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, en el que el animal es un ser humano.

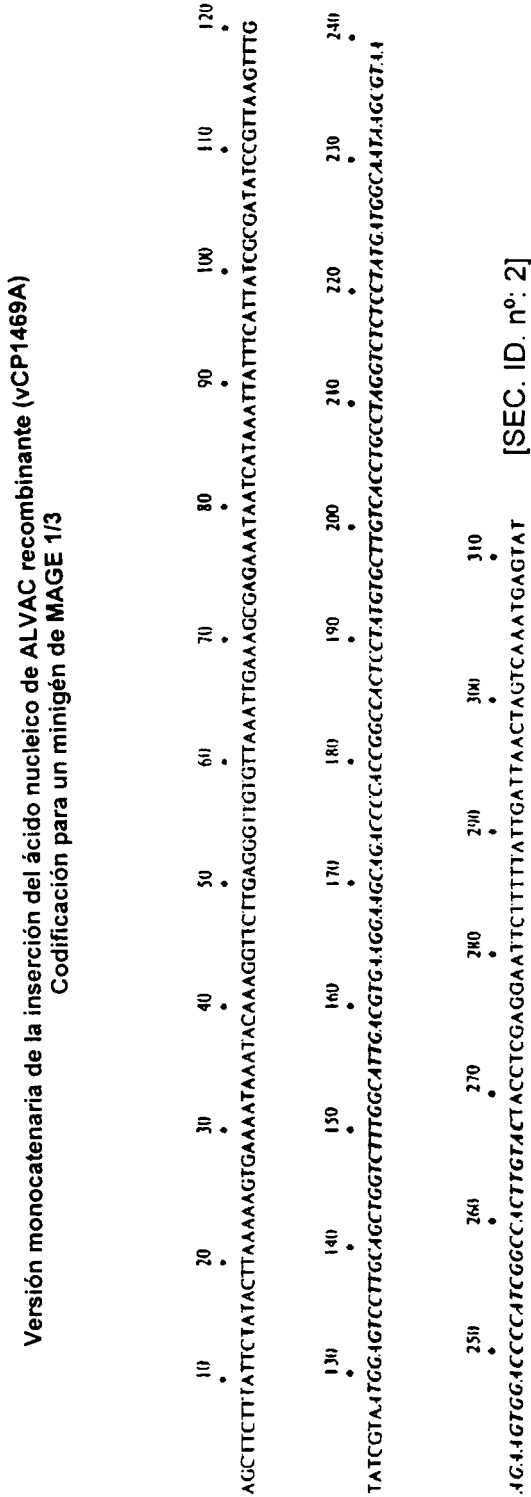
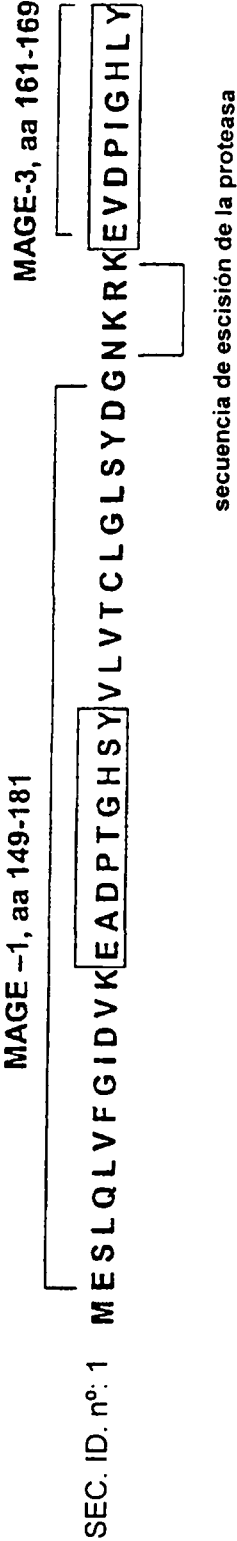


Figura 1

* La codificación de la secuencia del polipéptido del minigén de MAGE 1/3 está en negrita y cursiva.

Polipéptido codificado por el montaje vírico recombinante
ALVAC(1)-minigén MAGE-1/3 (vCP1469A)



Los epítomos del antígeno específico para MAGE de MAGE-1 y -3 están encuadrados.

Figura 2

Perfil de la cartografía de restricción del montaje vírico recombinante
ALVAC-minigén MAGE 1/3 (vCP1469A)

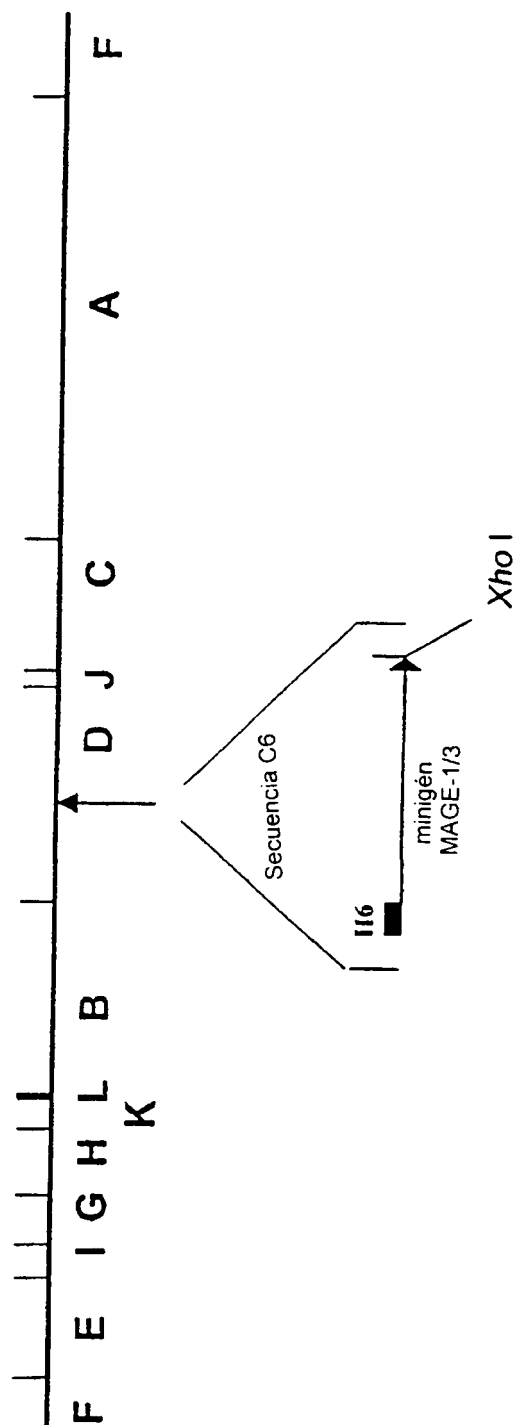


Figura 3

Capacidad del montaje vírico recombinante ALVAC(1)-minigén MAGE 1/3 (vCP1469A) para expresar el epítipo del antígeno específico tanto de MAGE 1 como 3

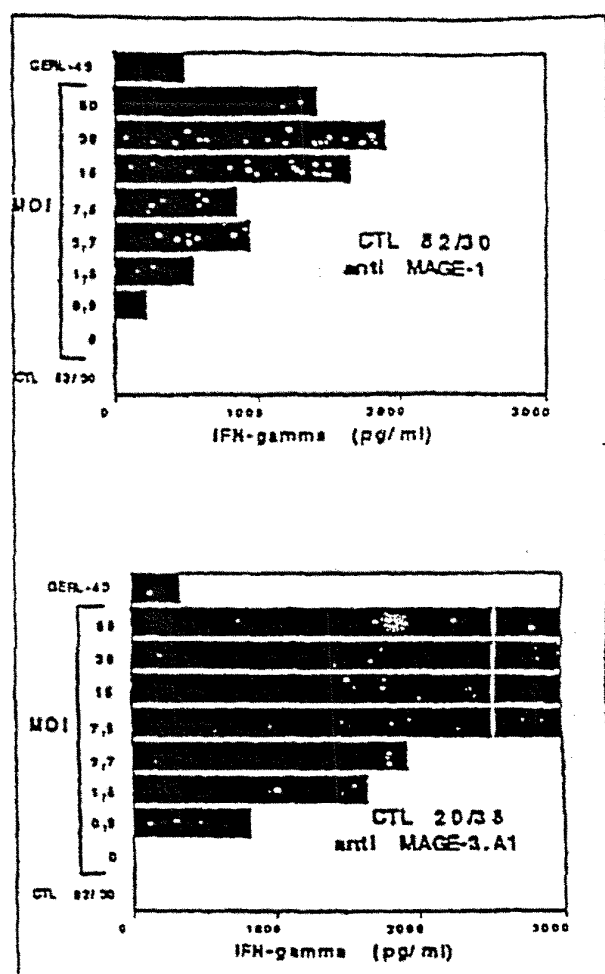


Figura 4

Capacidad del epítipo del antígeno específico de MAGE 1/3 derivada del minigén MAGE 1/3 para presentarse en asociación tanto con las moléculas MHC HLA-A1 como con HLA-B35

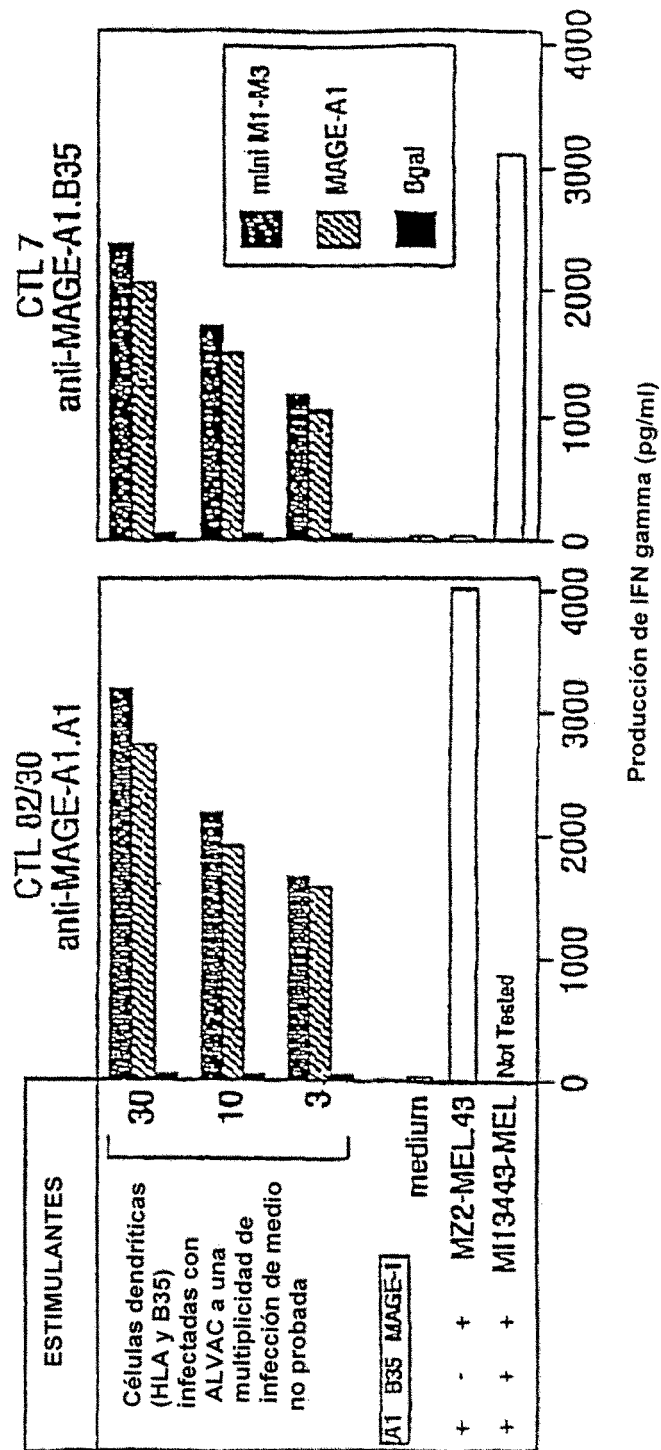


Figura 5

Capacidad del epitopo del antígeno específico de MAGE-3 derivada del minigén MAGE 1/3 para presentarse en asociación con las moléculas MHC HLA-B35

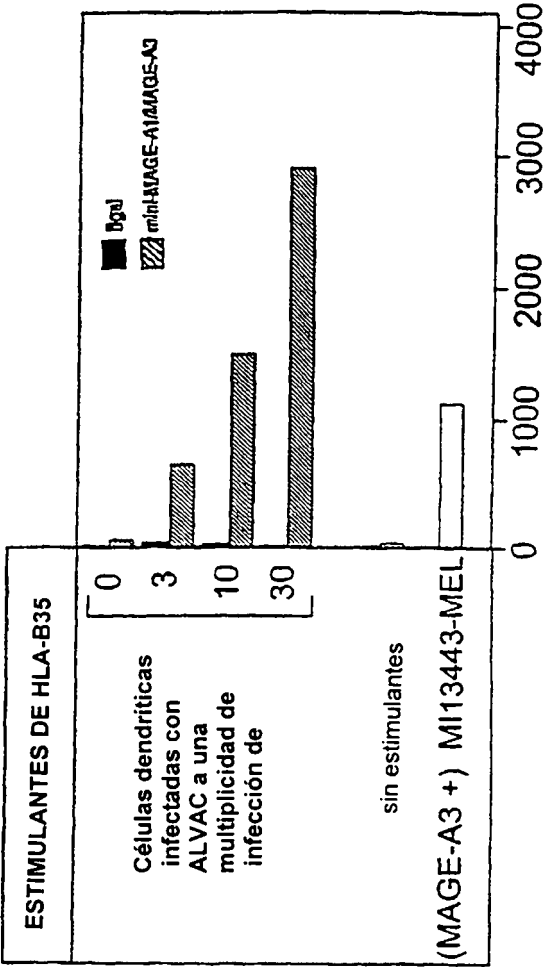


Figura 6

ES 2 276 788 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AVENTIS PASTEUR LIMITED

LUDWING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

Berinstein, Neil

Tartaglia, Jim

Tine, Jehn, A.

Moingeon, Philippe

Boon-Falleur, Thierry

Van der Bruggen, Pierre

<120> PÉPTIDOS INMUNÓGENOS CODIFICADOS POR MINIGENES MAGE Y SUS UTILIZACIONES

<130> 1038-1139 LAB

<150> US 60/202,970

<151> 10/05/2000

<150> US 60/203,578

<151> 11/05/2000

<150> US 60/242,388

<151> 20/10/2000

<160> 6

<170> PatentIn Ver.2.0

<210> 1

<211> 47

<212> PRT

<213> Polipéptido del minigén MAGE 1/3

<400> 1

Met Glu Ser Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu Ala
1 5 10 15

Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr Val Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu
20 25 30

Ser Tyr Asp Gly Asn Lys Arg Lys Glu Val Asp Pro Ile Gly His
35 40 45

Leu Tyr

<210> 2

<211> 141

<212> ADN

<213> Polipéptido del minigén MAGE 1/3

ES 2 276 788 T3

	<400> 2	
5	atggagtcct tgcagctggt ctttggcatt gacgtgaagg aagcagaccc caccggccac 60	
	tcctatgtgc ttgtcacctg cctaggtctc tcctatgatg gcaataagcg taaagaagtg 120	
10	gaccccatcg gccacttgta c	141
	<210> 3	
15	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> cebador	
20	<400> 3	
	ccctcgcgat atccgtaag ttgtatcgt aatggagtcc ttgcagctgg t	51
25	<210> 4	
	<211> 72	
	<212>ADN	
	<213> cebador	
30	<400> 4	
	gggctcgagc tagtacaagt ggccgatggg gtccagttct ttacgcttat tgccatcata	60
35	ggagagacct ag	72
	<210> 5	
	<211> 2	
40	<212> ADN	
	<213> cebador	
	<400> 5	
45	atcgcgatat ccgttaagtt tg	60
	<210> 6	
50	<211> 54	
	<212> ADN	
	<213> cebador	
55	<400> 6	
	gggctcgagc tagtacaagt ggccgatggg gtccacttct ttacgcttat tgcc	54
60		
65		