



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 087**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C12N 15/27 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)	C12N 15/62 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)	C12N 5/08 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)	C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)	A61K 35/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96944879 .4**

86 Fecha de presentación : **23.12.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0870022**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.10.1998**

54 Título: **Composición inmunoestimuladora y procedimiento.**

30 Prioridad: **28.12.1995 US 579823**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **DENDREON CORPORATION**
3005 1st Avenue
Seattle, Washington 98121, US

72 Inventor/es: **Laus, Reiner;**
Ruegg, Curtis, Landon y
Wu, Hongyu

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Composición inmunoestimuladora y procedimiento.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y a procedimientos para estimular respuestas inmunitarias celulares específicas *in vivo*. Más específicamente, la invención se refiere a la eliminación de células tumorales por linfocitos T citotóxicos (CTL) activados *in vivo* o *in vitro* por exposición a células presentadoras de antígeno expuestas a un complejo polipeptídico inmunoestimulador.

Antecedentes de la invención

La respuesta inmunitaria del sistema inmunitario de los mamíferos se divide en dos tipos generales: inmunidad humoral, mediada en gran medida por los anticuerpos de la circulación, y la inmunidad celular mediada por diferentes formas de células T. Los antígenos extracelulares estimulan una respuesta humoral, mientras que los antígenos intracelulares tales como los virus, estimulan una respuesta celular.

La respuesta inmunitaria celular a las células infectadas por virus y células tumorales es mediada en gran medida por linfocitos T citotóxicos (T_c o CTL), cuando reconocen antígenos extraños unidos a la superficie de la célula hospedante como parte del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), y más en particular, una forma común del MHC conocido como MHC de clase I. A diferencia de esto, los antígenos derivados de patógenos no víricos (bacterias, hongos) en general se expresan como parte de un complejo MHC de clase II. Una subpoblación diferente de células T efectoras (células de inmunidad mediada por células; IMC) libera citocinas que activan la célula hospedante para destruir dichos patógenos.

En sistemas experimentales, los CTL específicos de tumor-antígeno son el mecanismo inmunológico más poderoso para eliminar los tumores. Los CTL se pueden inducir *in vivo* con vacunas o se pueden generar *in vitro* y después volver a infundir en el organismo portador del tumor. La inducción *in vivo* de los CTL típicamente se logra por inmunización con virus vivos o células (Tanaka, y col., *J. Immunol.*, (1991), J47, 3646-52, Wang, y col., *J. Immunol.*, (1995), 4685-4692, Torre-Amione, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1990), 87, 1486-90).

Excepto para algunas proteínas víricas especiales tales como el antígeno T grande de SV-40 y el antígeno de superficie de la hepatitis B, la inyección de proteínas aisladas o solubles no dan como resultado la inducción de los CTL (Schirmbeck, y col., *Eur. J. Immunol.*, (1993), 23,1528-34). Los CTL son inducidos cuando una proteína entra en la ruta de clase I del procesamiento de antígenos. Para entrar en esta ruta, la proteína debe estar presente en el citosol de las APC. Se degrada en péptidos que después son transportados al retículo endoplasmático, donde se asocian con moléculas HLA nacientes de clase I. Estos péptidos después se presentan juntos con las moléculas de clase I sobre la superficie celular y pueden servir como un inductor y objetivo de los CTL específicos de antígenos restringidos por la clase I. Desde el punto de vista fisiológico, sólo entran en esta ruta las proteínas que las APC sintetizan de forma endógena.

Los vehículos de suministro no celular para proteínas, tales como los liposomas sensibles al pH, pueden superar el requisito de la síntesis endógena *in vivo* (Nair, y col., *J. Exp. Med.*, (1992), 175, 609-12, Nair, y col., *J. Virol.* (1993), 67, 4062-9); sin embargo, estos tratamientos también son bastante tóxicos para las células objetivo.

No se ha descrito la inducción de CTL primarios restringidos por HLA de clase I en proteínas puras solubles *in vitro*. La herramienta más común para la inducción *ex vivo* de los CTL primarios son péptidos sintéticos pequeños (oligómero de longitud 8-11) (Staass, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1992), 89, 7871-5, Carbone, y col., *J. Exp. Med.* (1988), 167, 1767-79). Estos péptidos sintéticos se asocian con moléculas de clase I en la superficie celular sin los requisitos del procesamiento endógeno. Cuando se presentan en la superficie de una APC adecuada (tal como una célula dendrítica) entonces pueden inducir una respuesta de CTL primarios. Sin embargo, con frecuencia estos CTL no protegen frente a la estimulación con patógenos que sintetizan de forma endógena la proteína de la cual derivó el péptido debido a su baja avidéz por el receptor de células T (Speiser, y col., *J. Immunol.* (1992), 149, 972-80) y porque inducen reactividad con un solo epítipo del antígeno objetivo.

GM-CSF es una citocina que tiene función pleiotrópica tanto en la hematopoyesis como en inmunología. Se ha mostrado que GM-CSF promueve la diferenciación y supervivencia de células dendríticas. GM-CSF se puede usar como un adyuvante sistémico (Jones, y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (1994), 13, S47-53).

Es bien conocido que la inmunización con proteínas solubles puede dar como resultado una respuesta de anticuerpos significativa. Sin embargo, puesto que la presentación de antígeno restringida por la clase II o la estimulación de células B directa son responsables de este efecto, la inducción de anticuerpos no tiene un valor de predicción para estimular la inducción de CTL mediada por la clase I. La mayoría de las proteínas que inducen anticuerpos *in vivo* no pueden inducir CTL.

Se ha mostrado que las proteínas de fusión GM-CSF inducen respuestas de anticuerpos *in vivo* en un modelo de linfoma en ratón (Levy, R. and Tao, M.-H. (1993) *Nature* 362:755-758; Chen, y col., *J. Immunol.* (1995), 3105-

3117). En este estudio se encontró que el idiotipo tumoral fusionado con GM-CSF era superior a la mezcla de ambas moléculas y a otros adyuvantes convencionales para la inducción de respuestas de anticuerpos. A diferencia de otros tumores sólidos, se cree que las respuestas de anticuerpos son el mecanismo efector para la protección tumoral y para la terapia tumoral en el linfoma.

Además, la inducción *in vitro* de inmunidad en general es mucho más difícil de lograr tanto para las respuestas celulares como humorales. Por ejemplo, los fibroblastos transfectados con antígeno vírico inducen CTL restringidos por la clase I *in vivo* en ratones, pero no lo hacen *in vitro* (Kündig, y col., *Science* (1995), 268, 1343-1347). Por lo tanto, un estudio de inducción de anticuerpos con proteínas de fusión GM-CSF *in vivo* no implica ninguna de sus utilidades *in vitro*, y en particular tiene poco valor de predicción de la inducción de CTL *in vitro* o *in vivo*.

Otros procedimientos que se han usado para la inducción *in vitro* de CTL derivados de proteínas primarias son el choque osmótico de células dendríticas y el uso de liposomas sensibles al pH (Nair, y col., *J. Exp. Med.* (1992), 175, 609-12). Sin embargo, dichos procedimientos han demostrado ser inherentemente ineficaces y tóxicos para las APC, porque alteran las membranas celulares mediante fuerza física y química con el fin de liberar el antígeno proteínico al citoplasma.

Estas limitaciones se superan por el descubrimiento que abarca la presente invención. El descubrimiento de la presente invención es que se puede estimular una respuesta de células T, y específicamente una respuesta de células T mediada por el MHC de clase I, mediante una proteína aislada o soluble, cuando se presenta al sistema inmunitario como parte de un complejo con la proteína de unión a las células dendríticas GM-CSF. El descubrimiento adicional de la presente invención es que dicha respuesta se puede estimular *in vitro*. Como se ha discutido antes, no se ha demostrado previamente la estimulación *in vitro* de dicha respuesta usando un antígeno soluble de longitud completa. La presente invención proporciona la inducción de proteínas aisladas o solubles de inmunidad celular *in vitro*, presentando un antígeno específico a una célula presentadora de antígeno (APC), tal como una célula dendrítica, como parte de una proteína de fusión inmunógena.

Un aspecto importante de la presente invención es la elección de la proteína pareja para la fusión: la proteína de unión a células dendríticas, tal como la proteína estimuladora de la colonia de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Sin basarse en ninguna teoría mecanística en particular, se cree que el antígeno proteico es transportado por la membrana plasmática de la APC de una forma en la que no haya alteración y mediada por el receptor. Se cree además que la parte de la proteína de fusión que se une a la célula dendrítica sirve para preservar la viabilidad y funcionalidad de la APC.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a la elección del antígeno objetivo. Aunque se ha mostrado que varios antígenos relacionados con tumores sirven como objetivos para la inmunidad mediada por células T *in vivo*, no se ha demostrado la inducción *in vitro* por antígenos polipeptídicos solubles aislados. (Fisk, y col., *J. Exp. Med.* (1995), 181, 2109-2117). En los experimentos llevados a cabo para apoyar la presente invención, ahora se ha demostrado que un antígeno tumoral específico de tejido, caracterizado dicho antígeno tumoral específico de tejido porque (i) incluye antígenos que son comunes para un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que son específicos sólo para un tumor individual, y un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53, pueden convertirse en dichos objetivos sensibilizando CTL con derivados de fusión de GM-CSF *in vitro*.

Resumen de la invención

En un aspecto, la invención se dirige a una composición terapéutica para estimular una respuesta inmunitaria celular. La composición es una célula presentadora de antígeno potente estimulada y aislada, tal como una célula dendrítica activada, que es capaz de activar células T para producir una respuesta inmunitaria celular multivalente contra un antígeno seleccionado. En general, la respuesta de células T medida es sustancialmente mayor que una respuesta de células T producida por dichas células presentadoras de antígeno potentes estimuladas solo por el antígeno seleccionado. En una realización preferida de la invención, la célula presentadora de antígeno potente se estimula por exposición de la célula *in vitro* a un complejo polipeptídico que consta de proteína de unión a células dendríticas, GM-CSF, y un antígeno tumoral específico de tejido, caracterizado dicho antígeno tumoral específico de tejido porque (i) incluye antígenos que son comunes para un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que son específicos sólo para un tumor individual, y un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53.

En otra realización preferida, la proteína de unión a células dendríticas que forma parte del complejo polipeptídico inmunoestimulador es GM-CSF. En otra realización preferida, el antígeno polipeptídico que forma parte del complejo es el antígeno específico de tumor la fosfatasa ácida prostática. En otras realizaciones preferidas más, el antígeno polipeptídico puede ser cualquiera de los antígenos peptídicos productos oncogénicos Her2, p21RAS y p53. El complejo polipeptídico también puede contener, entre la proteína de unión a células dendríticas y el antígeno polipeptídico, un péptido conector.

En un aspecto relacionado, la invención incluye un procedimiento para activar una célula presentadora de antígeno aislada *in vitro*. De acuerdo con el procedimiento, la activación incluye poner en contacto una célula presentadora de antígeno aislada con un complejo polipeptídico. El complejo polipeptídico usado en este procedimiento es como se ha descrito antes; es decir, consiste esencialmente en proteína de unión a células dendríticas GM-CSF covalentemente unida a un antígeno tumoral específico de tejido, caracterizado dicho antígeno tumoral específico de tejido porque (i)

incluye antígenos que son comunes para un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que son específicos sólo para un tumor individual, y un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53. De acuerdo con el procedimiento, la célula presentadora de antígeno activada es eficaz para activar una célula T para producir una respuesta inmunitaria celular multivalente que es sustancialmente mayor que la producida por células presentadoras de antígeno en contacto con el antígeno polipeptídico seleccionado solo. En una realización preferida, la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica, aislada, como se describe en este documento.

En otro aspecto relacionado más, la invención incluye un procedimiento para inducir una respuesta de células T citotóxicas en un sujeto vertebrado. De acuerdo con este aspecto de la invención, una célula dendrítica aislada se pone en contacto con un complejo polipeptídico inmunoestimulador de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas antes, durante un periodo de tiempo eficaz para activar la célula presentadora de antígeno. Después la célula presentadora de antígeno se inyecta en el sujeto mamífero. En una realización preferida, la célula presentadora de antígeno que se activa e inyecta es una célula dendrítica.

En otros aspectos relacionados, la invención también incluye complejos polipeptídicos formados como se ha descrito antes. Como se ha descrito antes, dichos complejos polipeptídicos se forman preferiblemente a partir de la proteína de unión a células dendríticas GM-CSF covalentemente unida a un antígeno tumoral específico de tejido, caracterizado dicho antígeno tumoral específico de tejido porque (i) incluye antígenos que son comunes para un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que son específicos sólo para un tumor individual, y un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53.

En otros aspectos relacionados, la invención también incluye vectores de expresión y sistemas de expresión para producir las proteínas de fusión inmunoestimuladoras descritas antes, así como moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que codifican dichas proteínas de fusión. En realizaciones preferidas, las moléculas de ácido nucleico codifican proteínas de fusión constituidas esencialmente por GM-CSF y fosfatasa ácida prostática o GM-CSF y Her2.

Breve descripción de las figuras

la fig. 1 muestra la secuencia del ácido nucleico (ID SEC N°: 1) y de aminoácidos deducida (ID SEC N°: 2) de la proteína de fusión PAP-GM-CSF que tiene como conector peptídico gly-ser que resulta del conector Bam HI (subrayado);

la fig. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión Fosfatasa ácida prostática humana/GM-CSF humano, con la secuencia señal de PAP no presente en la proteína madura mostrada con letras minúsculas, los potenciales sitios de N-glicosilación marcados "C", y los potenciales puentes disulfuros marcados "S-S";

las fig. 3A y 3B muestran representaciones esquemáticas de los vectores de expresión para PAP-GM pCEP4 PAPGM (3A) y PAPHGM-BAC (3B) usados en líneas de células de mamíferos (293 células) y de insectos (Sf21), respectivamente;

la fig. 4 muestra una gráfica de la bioactividad de GM-CSF de mamífero y las proteínas de fusión PAP-GM-CSF derivadas de baculovirus;

la fig. 5 muestra una gráfica de la bioactividad de la fosfatasa ácida de las proteínas de fusión PAP-GM-CSF;

la fig. 6 muestra una gráfica de lisis de células de carcinoma prostático por CTL sensibilizados para PAP-GM-CSF y estimulados con células presentadoras de antígeno pulsadas con PAP-GM-CSF;

la fig. 7 muestra una gráfica de barras que representa el bloqueo por el anticuerpo bloqueador de HLA de clase I de la lisis de las células de carcinoma de próstata por los CTL sensibilizados para PAP-GM-CSF;

la fig. 8 muestra las secuencias de ácido nucleico (ID SEC N°: 3) y aminoácidos (ID SEC N°:4) de una proteína de fusión GM-CSF-Her2 de acuerdo con la presente invención;

la fig. 9 muestra la valoración de la actividad de GM-CSF en líquidos sobrenadantes de cultivos en bruto de células de insectos baculovirus (BVIC) de cultivos de Sf21 infectadas con PAP de rata o PAP de rata-GM-CSF de ratón comparado con GM-CSF de ratón recombinante y la respuesta proliferativa resultante de la línea celular dependiente de GM-CSF GM-NFS-60;

la fig. 10 muestra un esquema de inmunización de ratas COP con células dendríticas purificadas pulsadas con PAP de rata-GM-CSF de rata;

la fig. 11 muestra la secuencia del ácido nucleico y de proteína deducida del gen de fusión p53-GM-CSF, en el que el conector Xba I que codifica la serina y arginina está recuadrado; y

la fig. 12 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión p53-GM-CSF con el conector de serina-arginina sintético impreso en negrita y subrayado.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

5 Tal como se usa en este documento, la expresión “antígeno específico de tejido” se refiere a un antígeno que es característico de un tipo de tejido, incluidos tejidos tumorales específicos. Un ejemplo de un antígeno específico de tejido expresado por un tejido tumoral es el antígeno fosfatasa ácida prostática, que está presente en más del 90% de todos los tumores de próstata. A modo de contraste, los linfomas de células B producen antígenos de inmunoglobulinas que son particulares para el tumor individual. Dichos antígenos tumorales particulares no se considera que estén dentro
10 de la definición de la expresión “antígeno específico de tejido”.

La expresión “producto oncogénico” se refiere a cualesquiera productos de oncogenes que incluyen Her2, p21RAS y p53.

15 “Células presentadoras de antígeno” (APC) son células que son capaces de activar células T, e incluyen, pero no se limitan, algunos macrófagos, células B y células dendríticas.

Las “células presentadoras de antígeno potentes (PAP)” son células que, después de ser pulsadas con un antígeno, pueden activar los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ nativos en una respuesta inmunitaria primaria.

20 La expresión “célula dendrítica” se refiere a cualquier miembro de una población diversa de tipos de células morfológicamente similares encontradas en tejidos linfoides y no linfoides. Estas células se caracterizan por su diferente morfología, altos niveles de expresión de MHC de clase II de superficie (Steinman y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 9:271 (1991); incorporado en este documento por referencia para la descripción de dichas células). Estas células se pueden aislar de una serie de fuentes de tejidos, y de forma conveniente de sangre periférica, como se describe en este documento.

La expresión “proteína de unión a células dendríticas” se refiere a GM-CSF.

30 II. Complejos polipeptídicos inmunoestimuladores

A. Selección de los componentes del complejo polipeptídico

Un polipéptido inmunógeno formado de acuerdo con la presente invención, en general se caracteriza como un
35 antígeno tumoral específico de tejido, caracterizado dicho antígeno tumoral específico de tejido porque (i) incluye antígenos que son comunes para un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que son específicos sólo para un tumor individual, y un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53, que está unido covalentemente a la proteína de unión a células dendríticas GM-CSF.

40 1. Antígenos polipeptídicos

Como se ha expuesto antes, los antígenos polipeptídicos aislados en general no estimulan la activación de células T *in vivo* o *in vitro*. El descubrimiento de la presente invención es que algunos tipos de antígenos polipeptídicos, cuando se acoplan a la proteína de unión a células dendríticas GM-CSF estimulan la activación de células T.

45 La presente invención identifica como particularmente útil para esta capacidad, (1) a los antígenos tumorales específicos de tejidos y (2) a los antígenos peptídicos productos oncogénicos seleccionados del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53. En el contexto de la presente invención, la expresión “antígenos tumorales específicos de tejido” se refiere a antígenos que son comunes de tipos específicos de tumores. A modo de contraste, los antígenos
50 que son específicos para un tumor individual particular, tal como el antígeno idiotipo asociado a tumor de linfoma de células B, se distinguen de los antígenos tumorales específicos de tejido en que tienen un epítipo característico que varía de un individuo a otro. Dichos antígenos son menos útiles en el contexto de la presente invención, puesto que un reactivo inmunoestimulador hay que diseñarlo para el tumor individual, y por consiguiente no forman parte de la invención.

55 Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos objetivo para un ataque inmunitario. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan, antígenos específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno prostático específico (PSA) en el cáncer de próstata. Otras moléculas objetivo pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con transformación tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiotipo) se han usado como objetivos para inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

60 Así, los ejemplos de antígenos tumorales específicos de tejido incluyen, pero no se limitan, fosfatasa ácida prostática (PAP; asociada con tumores prostáticos), Melan-A/MART-1 (asociado con melanoma; Coulie y col., 1994, *J. Exp. Med.* 180:35. Hawakami y col., 1994, *PNAS* 91:3515, Bakker y col., 1994, *J. Exp. Med.* 122:1005), tirosinasa/albino (asociado con melanoma; Kawakami y col., 1994, *J. Exp. Med.*). CD19, CD20 y CD37 (asociado con linfoma).

Igualmente, se pueden incorporar antígenos peptídicos productos oncogénicos seleccionados del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53, en complejos polipeptídicos de la presente invención como reactivos que en general se pueden usar para estimular respuestas de células T eficaces para reaccionar con tumores que llevan dichos antígenos.

Los antígenos polipeptídicos tales como los descritos antes, se pueden aislar, sintetizar o expresar de forma recombinante de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. En la mayoría de los casos, se han identificado secuencias de ADN codificadoras para estas moléculas. Dichos antígenos aislados pueden formar complejo químicamente con la proteína de unión a células dendríticas, GM-CSF, como se discute a continuación, o se pueden producir de forma recombinante construcciones de proteínas de fusión, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

Como ejemplo de lo anterior, la fosfatasa ácida prostática (PAP) es la isozima específica de la próstata de la enzima ubicua fosfatasa ácida. La PAP es una molécula secretada que se ha identificado como un marcador tumoral del suero que es específica para el cáncer de próstata. (Vihko, y col., *FEBS Lett.* (1988), 236, 275-281, Solin, y col., *Biochem. Biophys. Acta* (1990), 1048, 72-77). No hay pruebas en la bibliografía de que la PAP por sí misma pueda servir como inductora y objetivo para los CTL. Como se demuestra a continuación, la presente invención muestra que la PAP puede servir tanto como inductora de CTL como un objetivo en las células de cáncer de próstata, cuando se combina con la proteína de unión a células dendríticas GM-CSF y se usa para estimular células presentadoras de antígeno (ilustradas por células dendríticas) que después se usan para sensibilizar CTL.

2. Proteínas de unión a células dendríticas

El segundo componente del complejo polipeptídico de la presente invención es la proteína de unión a células dendríticas GM-CSF. Como se ha mencionado antes, sin basarse en ninguna teoría mecanística en particular, se cree que la presencia de dicha molécula en el complejo covalente con un antígeno proteico facilita el transporte del antígeno por la membrana plasmática de la célula presentadora de antígeno, y más en particular, la célula dendrítica, de un modo mediado por receptor y que no produce alteración. Además se cree que la parte de unión a células dendríticas de la proteína de fusión sirve para conservar la viabilidad y funcionalidad de la APC.

La proteína de unión a células dendríticas es el factor estimulador de la colonia de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Esta glicoproteína, que tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 23-33.000 por SDS-PAGE, es una citocina que tiene función pleiotrópica tanto en la hematopoyesis como en inmunología. El GM-CSF tanto humano como murino se sintetizan con una secuencia líder hidrófoba de 17 aminoácidos que se escinde proteolíticamente durante la secreción. Las proteínas maduras tienen 127 (humana) o 124 (murina) aminoácidos, y tienen pesos moleculares del polipéptido central de 14.700 y 14.400 respectivamente, pero comparten sólo 52% de la identidad de aminoácidos. Se ha encontrado que el factor tiene una función estimuladora en la diferenciación y supervivencia de células dendríticas y es activo tanto en formas glicosiladas como desglicosiladas.

Se ha mostrado que el GM-CSF humano y murino se unen a los sitios de unión tanto de alta afinidad ($K_D = 20-60$ pM) como de baja afinidad ($K_D = 1-6$ nM) en células de monocitos-macrófagos, neutrófilos y linajes celulares de eosinófilos. Se ha mostrado la competición de la unión de otro miembro de los factores estimuladores de colonias hematopoyéticas, Multi-CSF, cuando la unión se lleva a cabo a 37°. La unión de GM-CSF a receptores de alta afinidad da como resultado la rápida internalización y degradación de GM-CSF (Metcalf, D. and Nicola, N.A. (1995) *The Hemopoietic Colony-Stimulating Factors*, Cambridge University Press, NY). Estas propiedades se pueden usar para servir como una guía para la selección de proteínas de unión a células dendríticas adicionales útiles en la formación de complejos polipeptídicos inmunoestimuladores de acuerdo con la presente invención.

B. Formación de complejos polipeptídicos

Los complejos polipeptídicos se pueden formar por medios químicos, tales como por técnicas de acoplamiento convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, los péptidos se pueden acoplar usando un agente deshidratante tal como diciclohexilcarbodiimida (DCCI) para formar un enlace peptídico entre los dos péptidos. Alternativamente, se pueden formar uniones por grupos sulfhidrilo, grupos amino en épsilon, grupos carboxilo u otros grupos reactivos presentes en los polipéptidos, usando reactivos disponibles en el comercio. (Pierce Co., Rockford, IL).

Los complejos polipeptídicos también se pueden formar de manera recombinante como proteínas de fusión de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. El ejemplo 1 detalla los procedimientos usados para producir una proteína de fusión GM-CSF-PAP de acuerdo con la presente invención. Brevemente, la PAP humana se clonó de una línea celular de carcinoma de próstata de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Se mutó el codón de parada en el extremo 3' de la secuencia, y en su lugar se insertó un sitio Bam HI, para fusionar el ADNc de PAP al ADN de GM-CSF. El ADN de GM-CSF se clonó a partir de una biblioteca CMSP (células mononucleares de sangre periférica) de acuerdo con procedimientos estándar. Se insertó un sitio Bam HI en el extremo 5' del ADN, y se insertó un sitio de clonación XbaI en el extremo 3', junto con un codón de parada en el marco. Los ADNc generados por la PCR se hicieron digerir con las enzimas de restricción adecuadas y se clonaron en vectores de restricción para la transfección en líneas celulares específicas de mamífero o insecto. La figura 1 muestra las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos deducida del polipéptido de fusión PAP-GM-CSF que tiene un conector peptídico gly-ser. La figura 2 ilustra además la secuencia de la proteína de fusión con sitios potenciales de glicosilación indicados como "C" y los puentes disulfuro probables mostrados como "S-S". Las figuras 3A y 3B muestran representaciones esquemáticas de

los vectores de expresión de PAP-GM-CSF usados para la transfección de líneas celulares de mamífero (293) y de insecto (SF21), respectivamente.

Los vectores de expresión de fusión se usaron para transfectar células COS (expresión transitoria) así como células 293-EBNA de mamífero (Invitrogen) y células SF21 de insecto (Clontech, Palo Alto, CA). Los productos de proteínas de fusión se recuperaron de los líquidos sobrenadantes del cultivo tisular, y se purificaron por afinidad por paso por una columna de inmovilización de anticuerpo monoclonal anti-PAP humano. El análisis por SDS-PAGE puso de manifiesto bandas de proteínas que migraban a 75 kD y 64 kD como productos de células de mamífero e insecto, respectivamente. La banda de 75 kD corresponde a un tamaño que es aproximadamente 19,5 kD más largo que el tamaño predicho de la cadena principal del polipéptido PAP-GM-CSF que es 55,5 kD. Esto se puede explicar por la presencia de 5 sitios potenciales de N-glicosilación en la secuencia, cuya glicosilación aumentaría el M_r aparente de la proteína, y está de acuerdo con el hecho de que las células 293-EBNA contienen maquinaria de glicosilación humana completamente funcional. La proteína de fusión derivada de células de insecto era aproximadamente 8,5 kD más larga que la cadena principal del péptido PAP-GM-CSF. Estos datos están de acuerdo con los patrones de glicosilación conocidos en las células Sf21, de las que se ha publicado que utilizan los sitios de N-glicosilación, pero que sólo añaden hidratos de carbono truncados que típicamente terminan con la adición de un solo residuo de manosa.

Se ensayaron las bioactividades de PAP y GM-CSF de las moléculas de fusión en ensayos adecuados, detallados en el Ejemplo 2. Las proteínas de fusión derivadas de células tanto de insecto como de mamífero presentaban actividad de GM-CSF, como se puso de manifiesto por su capacidad para mantener el crecimiento de líneas celulares dependientes de GM-CSF (figura 4). Igualmente, ambos productos presentaban actividad de PAP (figura 5).

Las proteínas de fusión construidas para incorporar antígenos productos oncogénicos se ilustran por la incorporación del producto oncogénico Her2. Her2 es un receptor del factor de crecimiento que pertenece a la familia de receptores EGF-R. Es sobreexpresado por las células de cáncer de pecho, las células de cáncer de ovario y una variedad de otras células cancerígenas. El ADNc que codifica el dominio extracelular de Her2 se clona a partir de una línea celular de cáncer de pecho y se fusiona al ADNc de GM-CSF, esencialmente como se ha detallado antes para PAP-GM-CSF. La producción de la proteína soluble se puede verificar usando anticuerpos monoclonales específicos para Her2 en un ensayo ELISA, de acuerdo con procedimientos específicos conocidos en la técnica. La proteína de fusión incluye las secuencias para el dominio extracelular (aminoácidos 1-652) de Her2 (GenBank) y GM-CSF (figura 8). En esta proteína de fusión particular las dos proteínas están unidas por un conector de leucina/ácido glutámico que se genera por la inserción de un sitio XHO I.

El gen supresor de tumores celulares p53 se clona y fusiona con GM-CSF, como se describe en el Ejemplo 7. La secuencia del gen de fusión recombinante se muestra en la figura 11, y la secuencia del polipéptido p53-GM-CSF producido se muestra en la figura 12. La proteína de fusión p53-GM-CSF se usa para generar inmunidad anti-p53 como se describe para la inducción de inmunidad anti-PAP con PAP-GM-CSF en los Ejemplos 3, 4 y 6.

Otros antígenos productos oncogénicos seleccionados del grupo constituido por Her-2 y p21RAS se incorporan de forma similar en proteínas de fusión de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento, usando las secuencias publicadas.

III. Estimulación de células T

Un aspecto importante de la presente invención es la utilidad de las construcciones de complejos polipeptídicos descritos antes en un procedimiento para dirigir la pareja de la proteína antígeno a las células presentadoras de antígeno (APC), tal como el tipo de célula conocido como "célula dendrítica", descrita antes. De acuerdo con la invención, la dirección se produce de una forma que da como resultado la entrada en la ruta de clase I del procesamiento de antígenos. Después las APC se usan para sensibilizar los CTL *ex vivo* e *in vivo*, de acuerdo con los procedimientos discutidos a continuación.

Las células dendríticas son APC muy potentes, y son las únicas APC que pueden sensibilizar CTL nativos. Aunque los precursores de células dendríticas presentes en la sangre humana pueden recoger antígeno, no funcionan como APC potentes. Por otra parte, la célula dendrítica madura es la APC más potente, pero no recoge antígeno de forma espontánea *in vitro*. En el pasado, era necesario tratar las células dendríticas maduras con fuerza física (liposomas, choque osmótico) o recubrirlas con antígenos peptídicos pequeños exógenos (8-11 aminoácidos de longitud; en general nonámero) para permitir que actuaran como APC.

La presente invención permite la introducción de una proteína añadida de forma exógena en la ruta de clase I de una célula dendrítica madura. Dicha inducción se puede realizar *in vitro*, aislando APC tales como células dendríticas, "pulsando" o poniéndolas en contacto con el complejo polipeptídico durante un periodo de tiempo prolongado, y después usando las APC pulsadas para estimular células T autólogas *in vitro* o *in vivo*. En este último caso, las APC pulsadas se administran (aproximadamente 10^7 células/inyección) al sujeto. La respuesta del sujeto se mide siguiendo la inducción de una respuesta de células T citotóxicas, una respuesta de células T auxiliares y respuestas de anticuerpos frente al antígeno en células mononucleares de sangre periférica por procedimientos conocidos en la técnica. Se pueden administrar dosis múltiples para producir una respuesta adecuada.

El uso de células dendríticas estimuladas con antígeno de fusión de GM-CSF da resultados superiores a otros procedimientos, tales como las preparaciones de células dendríticas pulsadas con péptidos. Es decir, mientras que las células dendríticas pulsadas con péptidos de 8-11 unidades de longitud pueden inducir inmunidad, dicha inmunidad se dirige a un epítipo único de célula T. Las proteínas incorporadas en los liposomas o liberadas en las células dendríticas por choque osmótico inducen reactividad frente a epítopos múltiples de células T; sin embargo, este procedimiento es relativamente ineficaz debido a la toxicidad inherente de estos tratamientos para las células dendríticas.

A diferencia de esto, los antígenos de fusión de GM-CSF de la presente invención inducen inmunidad frente a epítopos múltiples y preserva y potencia al mismo tiempo la viabilidad y función de la célula dendrítica. En la práctica, se encuentra que las composiciones de la presente invención inducen una activación celular (células T) que es multivalente y sustancialmente mayor que la producida por un solo antígeno seleccionado.

En experimentos llevados a cabo para apoyar la presente invención, se usó la proteína de fusión que consistía en PAP y GM-CSF descrita en la sección previa, para la introducción *in vitro* en células dendríticas y posterior activación de células T citolíticas, como se detalla en el Ejemplo 4. Brevemente, se aislaron CMSP positivas para HLA-A2.1 por procedimientos estándar y se sensibilizaron con la proteína de fusión durante 2-5 días. Se redujeron las células TCD4⁺ de la mezcla celular, se separó en fracciones de alta y baja densidad, y los cultivos separados se volvieron a estimular semanalmente con APC pulsadas con PAP-GM-CSF autólogo. Se evaluó el potencial lítico de las células T presente en las fracciones usando un ensayo de liberación de cromo estándar usando una línea celular de carcinoma de próstata transgénico HLA-A2.1 como objetivo. Esta nueva línea celular se construyó de acuerdo con los procedimientos detallados en el Ejemplo 3 de este documento y es útil para seleccionar y analizar linfocitos T citotóxicos restringidos por HLA de clase I.

Los resultados de los ensayos de lisis se presentan en la figura 6. Como se muestra, de los cuatro cultivos de células T diferentes ensayados, tres presentaban sustancial citotoxicidad dependiente de la dosis frente al objetivo del carcinoma de próstata. El nivel de citotoxicidad más alto lo alcanzaron las células que se fraccionaron en la fracción de sedimento de alta densidad el día 5 (círculos blancos, día 5 P). Las células de alta (cuadrados blancos día 2 P) y baja (cuadrados negros, día 2 IF) sensibilizadas durante 2 días mostraron una potencia prácticamente igual. Los cultivos celulares obtenidos a partir de la fracción de la interfase de baja densidad el día 5 (círculos negros, día 5 IF) presentaron poca o no presentaron citotoxicidad.

La figura 7 muestra que la citólisis específica de tumor se redujo sustancialmente en presencia del anticuerpo de bloqueo específico de HLA de clase I W6/32 con una relación de efector:objetivo (E/O) de 10:1 y se es eliminada completamente por el anticuerpo con una relación E/O de 3,3/1. El anticuerpo de control CA 141 no redujo la muerte mediada por células T. Estos experimentos demuestran que la interacción con la célula objetivo es mediada por el receptor de células T clásico/ ruta específica de antígeno restringido por HLA de clase I.

Los resultados anteriores demuestran la eficacia de los complejos de polipéptido de fusión formados de acuerdo con la presente invención, para estimular las respuestas de células T *in vitro*. Estas respuestas se pueden comparar con las estimuladas por el antígeno solo (en ausencia de la proteína de unión a células dendríticas). Además, su carácter multivalente se puede ensayar por procedimientos estándar.

IV. Aplicaciones terapéuticas

A. Terapia *in vitro/ex vivo*

La presente invención proporciona la inducción de proteínas aisladas o solubles de inmunidad celular *in vitro* presentando un antígeno específico a una célula presentadora de antígeno (APC), tal como una célula dendrítica, como parte de una proteína de fusión inmunógena. Como se ha discutido antes dicha inducción en general no se observa *in vitro* usando antígenos solubles enteros como materiales de inducción.

En la práctica, las células dendríticas se aíslan de un individuo, usando procedimientos conocidos, o preferiblemente, como se describe en el Ejemplo 5. Las células dendríticas (u otras APC) se mezclan con 10 ng/ml equivalente de antígeno de fusión de GM-CSF, como se describe en el Ejemplo 4. Después se pueden reducir las células T CD4⁺ de la preparación por inmuoadsorción en fase sólida y después fraccionar para el enriquecimiento en células que tienen actividad citolítica. Después se administran dosis de aproximadamente 10⁷ células al sujeto por inyección intravenosa o central de acuerdo con procedimientos establecidos (p. ej., infusión en 30 a 60 minutos). La sensibilidad del sujeto a este tratamiento se mide por seguimiento de la inducción de una respuesta de células T citolíticas, una respuesta de células T auxiliares y respuesta de anticuerpo frente al antígeno en células mononucleares de sangre periférica, por procedimientos conocidos en la técnica.

Además del régimen de administración *in vivo* directo descrito antes, las células APC se pueden usar, por ejemplo en terapia somática *ex vivo*, dispositivos implantables *in vivo* y dispositivos extracorpóreos *ex vivo*. También se pueden usar en la selección de antigenicidad e inmunogenicidad de epítopos peptídicos de los antígenos específicos de tumor y virus.

En algunos casos, puede ser ventajoso usar células obtenidas de un individuo para tratar una afección en un segundo individuo. Por ejemplo, los individuos infectados por el VIH con SIDA a menudo no son capaces de armar respuestas de células T antivíricas. En dichos casos, los CTL se pueden aislar de individuos sanos con compatibilidad con HLA, tales como hermanos, estimularlos o sensibilizarlos con DC pulsado con antígeno *in vitro*, ampliarlos y volverlos a administrar a los individuos infectados por el VIH.

B. *Terapia in vivo*

Las composiciones de proteína de fusión descritas en este documento también se pueden administrar directamente a un individuo como una vacuna, con el fin de estimular las rutas de inmunidad celular del individuo *in vivo*. Aquí se administra una dosis de aproximadamente 5 a 200 microgramos/kg de proteína de fusión, preferiblemente los días 0, 14 y 28, con una dosis de refuerzo opcional a los 6 meses. La respuesta del sujeto se mide por seguimiento de la inducción de una respuesta de células T citotóxicas, una respuesta de células T auxiliares y respuesta de anticuerpo frente al antígeno en células mononucleares de sangre periférica por procedimientos conocidos en la técnica.

C. *Resultados de modelos experimentales de inmunoestimulación*

El Ejemplo 6A proporciona detalles de la construcción de antígenos de fusión y protocolos de inyección usados en un modelo experimental de rata de inmunoestimulación. Se inyectó directamente una proteína de fusión compuesta de PAP de rata y GM-CSF de rata en ratas (estimulación *in vivo*) o para estimular células dendríticas de rata para la posterior inyección en ratas (inducción *ex vivo*). Es necesario usar moléculas y células de rata, puesto que las células efectoras humanas no funcionan normalmente en otras especies y además son antígenas en otras especies, tales como la rata. Además, el antígeno objetivo (PAP) es diferente entre humanos y otras especies, y no se podría esperar que el GM-CSF humano produjera el mismo tipo de efecto en otras especies. Sin embargo, se entiende que el uso de células de rata en ratas proporcionará un sistema modelo para el uso de células y proteínas humanas en seres humanos.

Como se detalla en el Ejemplo 6, se preparó fosfatasa ácida prostática de rata (PAP de rata) de forma recombinante y se fusionó con GM-CSF de rata. Las células dendríticas de tejido esplénico de rata se pulsaron con PAP de rata-GM-CSF de rata y se inyectaron en ratas normales. Además, se ensayaron sistemas de liberación alternativos, puesto que la inmunización dirigida a PAP autóloga no se había llevado a cabo previamente, según el conocimiento de los autores de la invención.

En los estudios llevados a cabo para apoyar la presente invención y detallados en el Ejemplo 6B, se inmunizaron ratas con (i) células dendríticas pulsadas con PAP de rata-GM-CSF de rata, (ii) PAP de rata-GM-CSF de rata solo, o (iii) PAP de rata en adyuvante CFA convencional. Después se examinó en los órganos de las ratas (próstata más seis sistemas de órganos principales) la inmunopatología provocada por la inmunización dirigida por PAP autóloga. De acuerdo con el sistema de modelo de rata, se esperaba que una respuesta inmunitaria satisfactoria diera como resultado el objetivo inmunitario de los órganos que expresaban PAP, y en particular, de la próstata.

Como se muestra en la Tabla 1, los estudios de histopatología muestran que las inmunizaciones con células dendríticas pulsadas con PAP de rata-GM-CSF de rata o con proteína de fusión PAP de rata-GM-CSF de rata inducen autoinmunidad específica de órgano que se limita a la próstata. En contraste, la inmunización con PAP de rata/proteína CFA no produce este resultado. Este resultado demuestra que el propio PAP-GM-CSF y las células dendríticas pulsadas con PAP-GM-CSF producen autoinmunidad específica de antígeno que es significativamente mejor, y que de hecho no puede producir, el antígeno solo asociado con un adyuvante convencional.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 281 087 T3

TABLA 1

Histopatología^a de órganos de ratas inmunes y no inmunes

Rata n ^o	Cerebr o	Pulmón	Corazó n	Higad o	Riñón	Colon	Próstat a	Comentarios, próstata
1C	N	N	N	N	N	N	N	N
2C	N	N	N	N	N	N	N	N
3C	N	N	N	N	N	N	N	N
4C	N	N	N	N	N	N	N	N
5T	N	N	N	N	N	N	3	Prostatitis intersticial multifocal subaguda moderada
6T	N	N	N	N	N	N	2	Inflamación diseminada leve en el intersticio
7T	N	N	N	N	N	N	1	Trazas de Inflamación diseminada en el intersticio
8T	N	N	N	N	N	N	2	Inflamación multifocal leve en el intersticio
1CFA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	
2 CFA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	
1PAP GM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	Inflamación linfocítica multifocal leve en el intersticio
2 PAP GM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	Inflamación linfocítica multifocal leve en el intersticio

^a Clasificación de la patología: ND = no evaluada; N = no hay lesiones significativas; 1 = trazas/leve; 2 = leve; 3 = moderada; 4 = grave.

^b Grupos de inmunización: los animales 1C, 2C, 3C, 4C eran controles no inmunizados; los animales 5T, 6T, 7T, 8T se inmunizaron con células dendríticas pulsadas con PAP de rata-GM-CSF de rata; los animales 1CFA, 2CFA se inmunizaron con PAP de rata sumergida en CFA; los animales 1 PAP GM, 2 PAP GM se inmunizaron con PAP de rata-GM-CSF de rata recombinante.

Los siguientes ejemplos ilustran, pero no se pretende que limiten la invención de ninguna forma.

Ejemplo 1

Construcción de proteínas de fusión PAP/GM-CSF

5 Si no se describe lo contrario, los procedimientos de clonación generales se llevaron a cabo de acuerdo con técnicas estándar como describen Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989).

Se clonó PAP humana de la línea celular de carcinoma de próstata LnCaP.FGC (American Type Culture Collec-
 10 tion, Rockland Maryland; "ATCC"). Se sintetizaron cebadores oligonucleótidos sintéticos que contenían la secuencia CGGCTCTCCTCAACATGAGAGC de acuerdo con procedimientos estándar de Kyestone Labs (Menlo Park, CA). Estos cebadores son homólogos al extremo 5' de la secuencia de ADNc de PAP conocida que está publicada en la base de datos GenBank.

Se unieron los sitios de restricción Hind III, Mun I o Xho I, de acuerdo con los requisitos del vector de ex-
 15 presión particular usado. En el extremo 3' se construyó un oligonucleótido de secuencia CACAGGATCCATCTG TACTGTCCTCAGTACC que mutaba el codón de parada 387 de la secuencia de PAP y se sustituía por un sitio Bam HI que codifica los aminoácidos glicina y serina. Este sitio Bam HI se usó para fusionar el ADNc de PAP al ADNc de GM-CSF que se clonó a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), basándose en la secuen-
 20 cia que está publicada en GenBank. En el extremo 5' de GM-CSF se unió un sitio Bam HI a un oligonucleótido GACTGGATCCGACCCGCGCTCGCCC que es homólogo a los nucleótidos que codifican los aminoácidos 18-23 en la secuencia GM-CSF. El extremo 3' de GM-CSF se generó con un oligonucleótido GATCTCTAGAGCTTGGC CAGCCTCATCTGG que termina después de la parada en el marco de GM-CSF y crea un sitio de clonación Xba I. Se aisló Poli A+ARN de la línea celular LnCaP.FGC y de CMSP con el kit de rastreo Micro Fast (Invitrogen) de acuerdo con el manual suministrado por el fabricante. El Poli A+ARN se transcribió de forma inversa con el kit de ciclo de
 25 ADNc (Invitrogen) de acuerdo con los procedimientos descritos en el manual adjunto. Después la primera cadena del ADNc se sometió a 25 ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores descritos antes. Las condiciones en el ciclador térmico Perkin-Elmer 9600 eran las siguientes. Se llevaron a cabo 25 ciclos de amplifica- ción: Desnaturalización: 94°C, 15 segundos; reasociación a 55°C, 15 segundos; extensión a 72°C, 60 segundos. A los 25 ciclos le siguieron un periodo de extensión final de 420 segundos a 72°C. Los productos de la PCR se analizaron
 30 en geles de agarosa. Se hicieron digerir con las enzimas de restricción adecuadas y se clonaron en los vectores pCR3 (Invitrogen) para crear pCR3-PAP-GM (no se muestra), pCEP 4 (Invitrogen) para crear pCEP4-PAP GM (Fig. 3A) y en pBacPac 8 (Clontech) para crear PAPHGMBAC (Fig. 3B). Las secuencias de ADN de las construcciones clonadas se confirmaron usando procedimientos estándar en un secuenciador fluorescente Modelo ABI 373A (Applied Biosys- tems, Foster City, CA). La secuencia de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos deducidas se presentan como ID SEC N°: 1 y ID SEC N°: 2, en la Fig. 1, respectivamente.

Se electroporó pCR3 PAP-GM en células COS-7 (ATCC) para experimentos de expresión transitoria. Después de confirmar que una proteína del tamaño, identidad inmunológica y función predichos se podía expresar transitoriamente en células COS-7 y 293-EBNA (Invitrogen), se generaron transfectados estables en la línea celular de riñón embrió-
 40 nico humano 293-EBNA, usando un vector de expresión episomial pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA). Después de electroporación y selección en higromicina, se generaron clones recombinantes cultivando en placas las células en condiciones de dilución limitantes y seleccionando la bioactividad de PAP en los líquidos sobrenadantes de cultivo de tejido celular. Los clones de mayor producción se adaptaron a medio sin proteína y se hicieron crecer en biorreactores de fibra hueca CellMax (Gibco, Gaithersburg, MD). Se recogieron los medios gastados de los cultivos, se juntaron y se
 45 clarificaron por centrifugación. Después se pasaron por una columna de inmunoafinidad que se hizo por acoplamiento del anticuerpo monoclonal específico de PAP humano ATCC HB8526 (ATCC) a una resina de Sefarosa. Después de lavar, el material unido se eluyó a pH bajo, se neutralizó y se dializó frente a tampón fisiológico. La fracción eluida se analizó por electroforesis desnaturalizante en SDS-PAGE en condiciones de reducción. El gel resultante mostró una sola banda de proteína a 75 kD que corresponde al tamaño predicho de PAP-GM-CSF completamente glicosilado.

50 También se usó PAPHGM-BAC para generar un virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* recombi- nante (AcNPV, baculovirus) por recombinación homóloga de PAPHGM-BAC con el ADN vírico BacPAK6 (Clontech, Palo Alto, CA). Se usaron los reactivos del sistema de expresión del baculovirus BacPAK (Clontech) y se llevaron a cabo los procedimientos esencialmente como se describe en el manual del producto. PAPHGM-BAC y BacPAK6 se
 55 cotransfectaron en células SF21 (Clontech) por lipofección. El líquido sobrenadante del cultivo celular gastado se recogió el día 5. Se valoraron en células SF21 recientes que después se hicieron crecer en medio semisólido durante otros 4 días. Después de teñir las monocapas con rojo neutro, se identificaron las placas víricas y se cogieron con una pipeta Pateur. Los virus recombinantes purificados de la placa se eluyeron en medio reciente y después se usaron para seleccionar la producción de PAP-GM-CSF en células SF21 recientes. Se identificaron las placas positivas y se usaron
 60 para generar reservas de virus y proteína recombinante en ciclos posteriores de infección de células SF21 recientes. Se recogieron los medios de los cultivos de producción tres días después de infección. Después se procesaron como se ha descrito para PAP-GM-CSF, que se obtuvieron de células 293-EBNA. El análisis de la proteína purificada por inmunoafinidad puso de manifiesto una sola banda de proteína a 64 kD después de teñir con plata un gel de SDS- PAGE.

65

Ejemplo 2

Bioactividad de las proteínas de fusión PAP-GM-CSF

Se analizó en las proteínas de fusión PAP-GM-CSF de todos los sistemas de expresión descritos en el Ejemplo 1 la capacidad de mantener el crecimiento de las líneas celulares dependientes de GM-CSF. También se analizó la actividad enzimática en ensayos de fosfatasa ácida. Se usaron bioensayos estándar para determinar la bioactividad de GM-CSF.

Actividad de GM-CSF. Se usó la línea celular de eritroleucemia dependiente de GM-CSF TF-1 (ATCC, Rockville, MD) y la línea celular de leucemia monocítica aguda AML-193 (ATCC) para analizar si el GM-CSF retiene su bioactividad después de fusión con PAP. Las líneas celulares que se cultivaban habitualmente en medio que contenía GM-CSF se pusieron en medio regular durante 24 horas antes del ensayo. Se cultivaron en placa con 1500 células por pocillo por triplicado, en medio de cultivo tisular. Se añadieron a las células líquidos sobrenadantes de ensayo o GM-CSF recombinante como control positivo. Las células se cultivaron durante 72 horas y después se pulsaron durante 4 horas con timidina tritiada de 1 microcurie por pocillo para determinar la tasa de síntesis de ADN. La figura 4 muestra que el PAP-GM-CSF tanto derivado de células de mamífero como el derivado de células de insecto mantenían el crecimiento de líneas dependientes de GM-CSF. La bioactividad relativa calculada de PAP-GM-CSF es 20% de la actividad de las líneas celulares dependientes de GM-CSF recombinantes control en una base molar.

Actividad de fosfatasa ácida. Se determinó la bioactividad del segundo componente de la proteína de fusión en un ensayo enzimático de la actividad de fosfatasa ácida. La fosfatasa ácida se midió como la capacidad de la proteína para hidrolizar el para-nitrofenil-fosfato (pNPP) a pH ácido. Brevemente, el líquido de ensayo se diluyó en citrato sódico 50 mM pH 4,8. Se añadió pNPP con una concentración final de 2 mg/ml. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se añadió a la reacción un volumen igual de NaOH 1 M. El pNPP hidrolizado en estas condiciones tiene un color amarillo que se puede cuantificar con un espectrofotómetro a 405 nm. La figura 5 muestra que el PAP-GM-CSF tanto de las células derivadas de mamífero como derivadas de insecto hidrolizaban pNPP en condiciones ácidas.

Por lo tanto, está claro que la actividad biológica original tanto de PAP como de GM-CSF se conserva en las proteínas de fusión PAP-GM-CSF.

Ejemplo 3

Generación de una línea celular objetivo para linfocitos T citotóxicos restringidos por HLA de clase I

Si no se describe lo contrario, todas las técnicas de cultivo tisular, manipulaciones celulares y ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con técnicas estándar.

Con el fin de generar una línea celular de cáncer de próstata que se pudiera usar como una célula objetivo en un contexto genético definido, se generó una línea celular transgénica de cáncer de próstata HLA A2.1. HLA A2.1 es el elemento de restricción mejor estudiado en respuestas inmunitarias restringidas de HLA de clase I humano y es el alelo más frecuente en los caucásicos. Se aisló un ADNc que codifica la secuencia publicada (GenBank) de HLA A2.1 y se clonó a partir de la línea celular linfoblastoide JY. El ADNc de la cadena pesada de HLA A2.1 se amplificó con el cebador homodireccional 5'-AgACCCgAggATggCC-3' y el cebador antisentido 5'-CCTCTCTggAACAggAAAgATg-3'. Los procedimientos y las condiciones eran como se han descrito para PAP y GM-CSF excepto que se usó la línea celular JY (obtenida de Dr. Ed Engleman, Stanford University Blood Bank, Stanford, CA) como material de partida. El fragmento génico resultante se clonó en el vector pCR3 con el kit de clonación TA (Invitrogen). La línea celular de carcinoma de próstata LnCaP.FGC (ATCC) se transfectó con este plásmido de expresión que confiere la expresión de HLA A2.1. Las líneas celulares originales no expresan el alelo A2.1. Después de selección de fármaco en G418 (Gibco) los transfectantes resultantes se seleccionaron según la expresión de HLA A2.1 por inmunoadsorción en fase sólida ("panning") con un anticuerpo monoclonal específico de HLA A2.1 (BB7.1, ATCC). La línea celular resultante expresaba HLA A2.1 de forma homogénea mientras que su pariente permanecía negativa. Esta nueva línea celular transgénica es excepcionalmente útil en la selección y análisis de linfocitos T citotóxicos restringidos por HLA de clase I.

Ejemplo 4

Inducción de CTL específicos de cáncer de próstata por PAP-GM-CSF

Se usó un sistema de sensibilización y expansión *in vitro* de células T para establecer la utilidad de PAP-GM-CSF en la generación de CTL restringidos por HLA de clase I.

Se aislaron CMSP positivas para HLA A2.1 por procedimientos estándar de gradiente de densidad (FICOLL-HYPAQUE, Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) con una densidad de 1,077 g/ml. Las células se sensibilizaron con 10 ng/ml equivalente de PAP-GM-CSF durante 2 ó 5 días. (La potencia equivalente de GM-CSF se midió en una línea celular dependiente de GM-CSF como se ha detallado en el Ejemplo 3; el peso real usado era 20 veces mayor debido a la diferencia de tamaño y actividad específica de PAP-GM-CSF). Después se redujeron las células T CD4⁺ de la preparación celular por inmunoadsorción en fase sólida y se separaron en células de baja densidad y de alta densidad en un gradiente de densidad de 1,068 g/ml. Después se cultivaron las diferentes fracciones por separado en

medio AIM V (Gibco, Gaithersburg, MD) complementado con rIL-2 (20 U/ml). Se usaron CMSP autólogas que se cultivaron en PAP-GM-CSF 20 ng/ml en medio Aim V como células presentadoras de antígeno para la reestimulación a intervalos semanales. Se evaluó el potencial lítico de las células en un ensayo estándar de liberación de cromo de 4 horas con la línea celular de carcinoma de próstata transgénica con HLA A2.1 LnCaP.FGC como objetivo.

La figura 6 muestra la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos para carcinoma de próstata LnCaP.FGC/A2.1 por células presentadoras de antígeno pulsadas con PAP-GM-CSF. Se sensibilizaron PBL positivos para HLA-A2.1 con 10 ng/ml de GM-CSF equivalentes de PAP-GM-CSF durante 2 ó 5 días. Se redujeron las células T CD4⁺ de los cultivos y estos se separaron en fracciones de baja (IF) y de alta (P) densidad frente a un gradiente de densidad Nycodenz que tenía una densidad de 1,068 g/ml.

Para investigar si la citotoxicidad observada era un fenómeno mediado por células T citolíticas CD8⁺ restringidas por HLA de clase I, se realizó un ensayo de bloqueo con el anticuerpo monoclonal específico para HLA de clase I monomórfico W6/32 (ATCC). W6/32 bloquea la muerte mediada por HLA de clase I en ensayos estándar, mientras que el anticuerpo de control CA141 es específico para HLA de clase II (DR) y no interferirá con la muerte restringida por la clase I. Para este experimento se usaron los cultivos de células T que se obtuvieron de la fracción de sedimento de 5 días (descrito antes) que presentaban la citotoxicidad más alta. Las líneas de células T usadas en el experimento contenían 38% de células T positivas para CD3/CD8. Se evaluó su potencial lítico en un ensayo estándar de liberación de cromo de 4 horas con la línea celular de carcinoma de próstata transgénica HLA A2.1, LnCaP.FGC/A2.1, como objetivo. La figura 7 muestra que la citolisis específica de tumor era sustancialmente menor en presencia del anticuerpo de bloqueo de HLA de clase I W6/32 con una relación de efector:objetivo (E/O) de 10:1 y era eliminada completamente por el anticuerpo con una relación de E/O 3,3/1. El anticuerpo de control CA 141 no reducía la muerte mediada por células T. Estos experimentos demuestran que la interacción con la célula T objetivo es mediada por la ruta clásica específica de antígeno restringida por HLA de clase I/receptor de células T.

Ejemplo 5

Preparación de células dendríticas

Las capas leucocitarias preparadas a partir de una unidad de sangre de donantes voluntarios sanos positivos para HLA-A0201 se obtienen del Centro de Sangre de la Universidad de Stanford (Stanford, CA). Las células se recogen de los envases de leucocitos, se diluyen a 60 ml usando solución salina tamponada con fosfato sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (D-PBS; Gibco Laboratories, Grand Island, NY) y se disponen en capas sobre dos columnas de 15 ml de medio de separación de sílice coloidal organosilanizada (OCS) (preparado como describe Dorn en la patente de EE.UU. 4.927.749, incorporada en el presente documento por referencia, con una densidad de 1,0720 g/ml, pH 7,4, 280 mOsm/kg de H₂O) en tubos de centrífuga de 50 ml, preferiblemente tubos con trampas celulares. El medio OCS preferiblemente se prepara haciendo reaccionar y así bloqueando los grupos silanol de la sílice coloidal (aproximadamente partículas de 10-20 mm de diámetro) con un reactivo de alquil-trimetoxi-silano.

Se describen sílices coloidales relacionadas y procedimientos para su producción en la patente de EE.UU. 4.927.749 de Dorn. En una realización preferida, el material de gradiente de densidad de OCS se diluye a una densidad específica adecuada en una solución salina fisiológica complementada con polivinilpirrolidona (PVP) tal como PVP-10 disponible en Sigma Chemical C. (St. Louis, MO).

Los tubos se centrifugan a 1000 x g durante 35 minutos a temperatura ambiente. Se para el funcionamiento de la centrífuga sin frenar y se recogen las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) presentes en la interfase.

Las CMSP se vuelven a suspender en D-PBS, se centrifugan a 650 x g durante 10 minutos y dos veces más a 200 x g durante 5 minutos para separar las plaquetas. Las CMSP reducidas en plaquetas se vuelven a suspender en 60 ml de D-PBS, se disponen en capas en la parte superior de dos columnas de 15 ml de OCS (densidad 1,0610 g/ml, 270 mOsm/kg de H₂O) en un tubo de centrífuga y se centrifugan a 650 x g durante 25 minutos a 4°C sin frenar. La interfase resultante (principalmente monocitos) y las células sedimentadas (principalmente linfocitos) se recogen y se lavan con D-PBS por centrifugación a temperatura ambiente (una vez a 650 x g durante 10 minutos y dos veces después a 200 x g durante 5 minutos).

En los casos en los que se usan células dendríticas para generar los linfocitos T citotóxicos específicos de péptidos CTL con el fin de elucidar su función de presentación de antígeno, la fracción de interfase (principalmente monocitos) se vuelve a suspender en suero AB humano mezclado frío (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) al que se añade gota a gota un volumen igual de suero AB al 80% dimetilsulfóxido al 20% (DMSO) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). La suspensión celular resultante se divide en partes alícuotas en crioviales y se congelan en nitrógeno líquido. Los monocitos se pueden usar para la reestimulación de CTL para la expansión.

La fracción de sedimentos se vuelve a suspender en 100 ml de medio de cultivo AB, se inocula en dos matraces de cultivo celular T-75 y se cultivan en un incubador humidificado con CO₂ al 5% durante 40 horas. Después de la incubación, se recogen las células no adherentes mediante pipeteo moderado, se lavan y se vuelven a suspender con una concentración de 2-5 x 10⁶ células/ml de medio de cultivo AB. La suspensión celular se dispone en capas en cuatro columnas de 4,0 ml de medio de separación OCS (densidad 1,0565 g/ml, pH 7,4, 280 mOsm/kg de H₂O), en medio de cultivo AB y se centrifuga a 650 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente sin frenar.

La interfase y las células sedimentadas se recogen y se lavan con medio de cultivo AB (medio RPMI-1640 basal, Gibco Laboratories, Grand Island, NY) por centrifugación una vez a 650 x g durante 10 minutos y dos veces después a 200 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente ambos. El rendimiento y la viabilidad de ambas fracciones celulares se calculan por recuento en un hemocitómetro usando exclusión con tinta azul de tripano.

La pureza de las células dendríticas en la fracción de la interfase se cuantifica por análisis en un citómetro de flujo (FACS). Las células dendríticas se caracterizan como negativas para los marcadores de fenotipo celular CD3 (linfocitos T), CD14 (monocitos), CD16 (células NK) y CD20 (células B) y positivas para la expresión de HLA de clase II usando la tinción doble con HLA-DR (en el canal FITC) y un cóctel de CD3, CD14, CD16, CD20 (en el canal PE). Se puede usar la tinción doble con IgG2a tanto en el canal FITC como PE como control de isotipo.

La morfología de las células también se puede evaluar usando fotomicroscopía. La fracción enriquecida en DC contiene células cubiertas de gran tamaño, extendiéndose los procesos citoplasmáticos desde la superficie celular, característicos de DC.

Ejemplo 6

Eficacia in vivo de células dendríticas pulsadas con PAP-GM-CSF

A. Construcción, expresión y bioactividad de proteínas de fusión de PAP de rata y GM-CSF recombinantes

Se construyó PAP de rata-GM-CSF de rata recombinante, como sigue: se amplificó el ADNc de PAPr a partir de la primera cadena del ADNc hecha a partir de ARNm aislado de próstata de rata (Harlan) usando cebadores que delineaban el fragmento que contenía los nucleótidos 15-1177 (Genbank Acc. M32397) y que añadía un sitio de restricción Xho I exógeno en el extremo 5' y sitios BamHI y Bln I exógenos en el extremo 3' para facilitar la inserción en el vector pBacPAK8. En ausencia de fusión de GM, el sitio Bln I codifica un codón de parada dentro del marco. El ADNc de GM-CSF de rata maduro se amplificó por PCR a partir de la primera cadena del ADNc hecha a partir de ARNm aislado de esplenocitos de rata estimulados con ConA usando cebadores que delineaban los nucleótidos 1-384 (GenBank Acc. U00620) y añade un sitio BamHI exógeno en el extremo 5' y un sitio Xba I exógeno en el extremo 3'.

Los plásmidos PAP de rata y PAP de rata-GM-CSF de rata se mezclaron cada uno con plásmido de genoma vírico BV linearizado y las mezclas se transfectaron en células SF21 usando lipofectina como se suministra en un kit de transfección de BV recombinante (Clontech). Seis días después de la transfección, se recogieron los líquidos sobrenadantes de los cultivos y se valoraron las monocapas de Sf21 bajo la agarosa para formar placas víricas. Cuatro días más tarde las células se tiñeron con rojo neutro y se cogieron las placas víricas candidatas y se expandieron en células Sf21 para seleccionar el BV recombinante usando la actividad enzimática de PAP como lectura. Se eligieron clones de BV PAP⁺ y se expandieron en cultivos en suspensión a gran escala de SF21 para reservas víricas y posteriormente para la producción de proteínas usando medio Sf900 II sin proteínas (Gibco/BRL).

Todas las proteínas presentaban actividad enzimática de PAP como se mostraba por la hidrólisis del PNPP, el sustrato enzimático usado en un ensayo estándar de fosfatasa ácida, en el caso de las proteínas de fusión GM-CSF, bioactividad de GM-CSF como se mostraba por el bioensayo en células GM-NFS-60. Se determinó la bioactividad de GM-CSF de un ejemplo representativo de proteína de fusión, PAP de rata-GM-CSF de rata (figura 9) en un ensayo de proliferación de células de rata con GM-CSF llevado a cabo usando la línea celular dependiente de GM-CSF, GM-NFS-60. Se cultivaron en placa 5000 células por pocillo en 200 µl de medio con las cantidades indicadas de citocina. La proliferación se determinó pulsando con [³H]timidina 1 µCi por pocillo durante las 4 h finales de un ensayo de 48 h. Se diluyeron con líquidos sobrenadantes de cultivo de baculovirus brutos o con GM-CSF de ratón recombinante (rmGM) 10 ng/ml disponible en el comercio, y se añadieron a las células cultivadas como se ha indicado, y se midió la proliferación.

La PAP de rata se expresó como una proteína de fusión con una cola de 6 restos histidina (PAP de rata(His₆)) unida a su extremo C. Se purificó por cromatografía de afinidad de quelato metálico (columnas Ni-NTA), de acuerdo con los procedimientos estándar. Una purificación típica daba como resultado >90% de proteína recombinante pura. La purificación de PAP de rata-GM-CSF de rata se realizó por una combinación de cromatografía de intercambio iónico/interacción hidrófoba. Este procedimiento típicamente da >50% de pureza de PAP de rata-GM-CSF.

B. Inmunización de animales

Se usaron ratas macho engendradas por endogamia en todos los estudios que se diseñaron para abordar la inmunogenicidad de PAP de rata *in vivo*. El objetivo de dichos estudios era determinar si podría determinar la inmunidad frente al PAP de rata autoantígeno.

Se inmunizaron ratas macho normales de 8 semanas de edad (Wistar o COP) con PAP en CFA (aproximadamente 200 µg) o con proteína de fusión PAP-GM-CSF (200 µg). Tras concluir la inmunización, las ratas se mataron por eutanasia y se examinaron las próstatas desde el punto de vista histológico. Un grupo adicional de ratas se trató con células dendríticas pulsadas con PAP de rata-GM-CSF de rata. Se aislaron las células dendríticas de los bazo de las ratas como se indica en la figura 10, se pulsaron toda la noche con PAP de rata-GM-CSF de rata que se había purificado

del líquido sobrenadante del cultivo de baculovirus por una combinación de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico. Se volvieron a inyectar las células (5-10 x 10⁶ células/rata) en hospedantes singénicos. Dos semanas después de la tercera inmunización, los animales se sacrificaron y un veterinario especialista en histopatología analizó la próstata, cerebro, pulmones, corazón, hígado, riñón y colon, y los comparó con tejidos de animales control que no se habían inmunizado.

El fenotipo de las células dendríticas de rata se determinó usando citometría de flujo. Para determinar su capacidad de presentación de antígeno, las células se usaron como estimuladores en una reacción mixta con linfocitos alogénicos y se comparó su capacidad aloestimuladora con esplenocitos totales y con esplenocitos adherentes. El intervalo típico de la pureza de las células dendríticas obtenidas por este procedimiento en general es entre 30% y 80%. Se analizó la capacidad presentadora de antígeno de las células dendríticas de las ratas usándolas como estimuladores en una reacción mixta con linfocitos alogénicos con esplenocitos de rata SD como respondedores. Su capacidad aloestimuladora se comparó con los esplenocitos totales y con esplenocitos adherentes de cepas tanto COP como SD.

Los esplenocitos de SD no se estimularon con esplenocitos de SD singénicos, esplenocitos adherentes o células dendríticas. Cuando se usan estimuladores de COP alogénicos, la fracción de células dendríticas estimula varios órdenes de magnitud más fuerte que las células del bazo o células del bazo adherentes de las ratas COP.

Histopatología de ratas inmunizadas. El estudio histopatológico lo llevó a cabo un veterinario especialista en histopatología de acuerdo con procedimientos estándar. Se vigiló en los animales los cambios histopatológicos de la próstata, cerebro, pulmones, corazón, hígado, riñón y colon, como se resume en la Tabla 1. Ninguno de los órganos de los animales de control (1C, 2C, 3C, 4C) mostró cambios significativos. Ninguno de los órganos salvo las próstatas en los animales tratados mostró cambios significativos. Todos los animales tratados con células dendríticas pulsadas con PAP de rata-GM-CSF de rata padecían prostatitis intersticial. La intensidad variaba: un animal (7T) tenía lesiones de grado 1 (= trazas), dos animales (6T, 8T) tenían lesiones de grado dos (= leve) y un animal (5T) tenía lesiones de grado 3 (= moderado). Los animales que se inmunizaron con PAP de rata en CFA (1CFA, 2CFA) no mostraron ninguna histopatología de la próstata. Los animales que se inmunizaron con proteína PAP de rata-GM-CSF (1 PAP GM, 2 PAP GM) tenían una prostatitis linfocítica intersticial de grado 1.

Ejemplo 7

Construcción y expresión de proteínas de fusión p53-GM CSF

Se clonó el gen supresor de tumores celulares p53 de acuerdo con las secuencias conocidas públicamente (base de datos de Genbank, salida 91, entrada HSPS3) mediante la reacción en cadena de la polimerasa con el cebador homosen-tido CgCggATCCTCACTgCCATggAggAgC y el cebador antisentido CTAgtCTAgACTCTgAgTCaggCCCTTCTg TC que incluye un sitio XBA I que codifica un conector de serina-arginina. Se clonó GM-CSF como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se usaron los cebadores CTAgtCTAgATCTgCACCCgCCCgCTCgCCC (homosen-tido) y CCggAATTCTCagTgATggTgATggTgATgCgATCCTCTCATCTCCTggACTggCTCCCAgC (antisentido). El ceba-dor antisentido codifica la secuencia MetArgGlySerHisHisHisHisHisHis que está unida al extremo C de GM-CSF y se puede usar para detección y para la purificación por cromatografía de afinidad de quelato metálico de la proteína de fusión. Las secuencias resultantes se muestran en las figuras 11 y 12. El vector de transferencia de baculovirus recombinante y el baculovirus recombinante se generaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Cuando se expresaba en células de insecto SF21 como se detalla en el Ejemplo 1, este baculovirus produce la proteína de fusión p53-GM-CSF que se usa para generar inmunidad anti-p53 como se describe para la inducción de la inmunidad anti-PAP por PAP-GM-CSF en los ejemplos 3, 4 y 6. La secuencia del gen de fusión recombinante se muestra en la figura 11. La secuencia del polipéptido producido p53-PAP-GM-CSF se muestra en la figura 12.

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica, que comprende una célula presentadora de antígeno potente aislada, en la que dicha célula se estimula por exposición *in vitro* a un complejo polipeptídico soluble aislado que comprende una proteína de unión a células dendríticas que es el factor estimulador de la colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) unida covalentemente a un antígeno polipeptídico,
dicho antígeno polipeptídico se selecciona del grupo constituido por
un antígeno tumoral específico de tejido y dicho antígeno tumoral específico de tejido se **caracteriza** porque (i) incluye antígenos que son comunes a un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que sólo son específicos para un tumor individual, y
un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53,
en la que dicha composición es eficaz para activar las células T para producir una respuesta inmunitaria celular multivalente contra dicho antígeno polipeptídico, a un nivel de activación de células T mayor que el producido por tal célula presentadora de antígeno potente estimulada por dicho antígeno solo.
2. La composición terapéutica de la reivindicación 1, en la que el antígeno polipeptídico es el antígeno tumoral específico de tejido fosfatasa ácida prostática.
3. La composición terapéutica de la reivindicación 1 ó 2, en la que el complejo polipeptídico comprende además, entre dicha proteína de unión a células dendríticas y dicho antígeno polipeptídico, un péptido conector.
4. La composición terapéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula presentadora de antígenos potente es una célula dendrítica activada.
5. Un procedimiento para activar una célula presentadora de antígeno aislada *in vitro*, que comprende poner en contacto dicha célula presentadora de antígeno aislada con un complejo polipeptídico que comprende una proteína de unión a células dendríticas que es el GM-CSF covalentemente unida a un antígeno polipeptídico seleccionado del grupo constituido por
un antígeno tumoral específico de tejido, estando dicho antígeno tumoral específico de tejido **caracterizado** porque (i) incluye antígenos que son comunes a un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que sólo son específicos para un tumor individual, y
un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53, en el que dicha célula presentadora de antígeno activada es eficaz para activar una célula T para producir una respuesta inmunitaria celular multivalente que es mayor que la producida por células presentadores de antígeno en contacto con el antígeno polipeptídico seleccionado solo.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho antígeno polipeptídico es el antígeno tumoral específico de tejido fosfatasa ácida prostática.
7. El procedimiento de la reivindicación 5 ó 6, en el que el complejo polipeptídico es una proteína de fusión, obtenible por traducción de una región codificadora de nucleótidos continua.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dicha célula presentadora de antígeno aislada es una célula dendrítica.
9. Uso de una célula presentadora de antígeno para preparar una composición farmacéutica para inducir una respuesta de células T citotóxicas en un sujeto mamífero para tratar un tumor en el mismo, en el que la célula presentadora de antígeno se ha puesto en contacto *in vitro* con un complejo polipeptídico que comprende una proteína de unión a células dendríticas que es GM-CSF, unida covalentemente a un antígeno polipeptídico seleccionado del grupo constituido por un antígeno tumoral específico de tejido, estando dicho antígeno tumoral específico de tejido **caracterizado** porque (i) incluye antígenos que son comunes a un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que sólo son específicos para un tumor individual, y un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53, durante un periodo de tiempo eficaz para activar dicha célula presentadora de antígeno.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que dicha célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.
11. Un polipéptido inmunoestimulador, que comprende un antígeno tumoral específico de tejido aislado unido covalentemente a una proteína de unión a células dendríticas que es GM-CSF, en el que el antígeno tumoral específico de tejido incluye antígenos que son comunes para un tipo de tumor específico y excluye antígenos que son específicos solo para un tumor individual.

12. El polipéptido de la reivindicación 11, en el que dicho antígeno tumoral específico de tejido es fosfatasa ácida prostática.

13. El polipéptido de la reivindicación 11 ó 12, en el que el polipéptido es una proteína de fusión, obtenible por traducción de una región codificadora de nucleótidos continua.

14. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que además incluye entre dicha proteína de unión a células dendríticas y dicho antígeno tumoral específico de tejido, un péptido conector.

15. Un polipéptido inmunoestimulador que comprende un producto oncogénico aislado seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53 unido covalentemente a una proteína de unión a células dendríticas que es GM-CSF.

16. El polipéptido de la reivindicación 14 ó 15, en el que el polipéptido es una proteína de fusión, obtenible por traducción de una región codificadora de nucleótidos continua.

17. El polipéptido de la reivindicación 15 ó 16, que además incluye, entre dicha proteína de unión a células dendríticas y dicho antígeno de producto oncogénico, un péptido conector.

18. Un vector de expresión para producir una proteína de fusión inmunoestimuladora, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un complejo polipeptídico que comprende una proteína de unión a células dendríticas que es GM-CSF y un antígeno polipeptídico seleccionado del grupo constituido por un producto oncogénico seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53, y un antígeno tumoral específico de tejido, dicho antígeno tumoral específico de tejido **caracterizado** porque (i) incluye antígenos que son comunes a un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que sólo son específicos para un tumor individual, dicha molécula de ácido nucleico está insertada en un vector de expresión, en el que dicha molécula de ácido nucleico está unida operativamente a un promotor seleccionado capaz de iniciar la transcripción en una célula hospedante seleccionada.

19. El vector de expresión de la reivindicación 18, en el que dicho antígeno polipeptídico es el antígeno tumoral específico de tejido fosfatasa ácida prostática.

20. Una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que codifica una proteína de fusión que comprende GM-CSF y fosfatasa ácida prostática.

21. Una molécula de ácido nucleico sustancialmente purificada que codifica una proteína de fusión que comprende GM-CSF y Her-2.

22. Un sistema de expresión para producir una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a células dendríticas que es GM-CSF, unida covalentemente a un antígeno polipeptídico seleccionado del grupo constituido por

un producto oncogénico, seleccionado del grupo constituido por Her-2, p21RAS y p53, y

un antígeno tumoral específico de tejido, dicho antígeno tumoral específico de tejido **caracterizado** porque (i) incluye antígenos que son comunes a un tipo específico de tumor, y (ii) excluye antígenos que sólo son específicos para un tumor individual, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de unión a células dendríticas que es GM-CSF,

una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno polipeptídico, cada una de dichas secuencias de ácido nucleico insertadas en un vector de expresión, en el que dichas secuencias de ácido nucleico están unidas operativamente a un promotor capaz de iniciar la transcripción en una célula hospedante seleccionada, y

dicho vector de expresión se lleva dentro de la célula hospedante.

CGGCTCTCCT	CAACATGAGA	GCTGCACCCC	TCCTCCTGGC	CAGGGCAGCA	50
	MetArg	AlaAlaProL	euLeuLeuAl	aArgAlaAla	
AGCCTTAGCC	TTGGCTTCTT	GTTCCTGCTT	TTTTCTGGC	TAGACCGAAG	100
SerLeuSerL	euGlyPheLe	uPheLeuLeu	PhePheTrpL	euAspArgSe	
TGTACTAGCC	AAGGAGTTGA	AGTTTGTGAC	TTTGGTGTTC	CGGCATGGAG	150
rValLeuAla	LysGluLeuL	ysPheValTh	rLeuValPhe	ArgHisGlyA	
ACCGAAGTCC	CATTGACACC	TTTCCCACTG	ACCCCATAAA	GGAATCCTCA	200
spArgSerPr	oileAspThr	PheProThrA	spProIleLy	sGluSerSer	
TGGCCACAAG	GATTTGGCCA	ACTCACCCAG	CTGGGCATGG	AGCAGCATTA	250
TrpProGlnG	lyPheGlyGl	nLeuThrGln	LeuGlyMetG	luGlnHisTy	
TGAACTTGGG	GAGTATATAA	GAAAGAGATA	TAGAAAATTC	TTGAATGAGT	300
rGluLeuGly	GluTyrIleA	rgLysArgTy	rArgLysPhe	LeuAsnGluS	
CCTATAAACA	TGAACAGGTT	TATATTCGAA	GCACAGACGT	TGACCGGACT	350
erTyrLysHi	sGluGlnVal	TyrIleArgS	erThrAspVa	lAspArgThr	
TTGATGAGTG	CTATGACAAA	CCTGGCAGCC	CTGTTTCCCC	CAGAAGGTGT	400
LeuMetSerA	laMetThrAs	nLeuAlaAla	LeuPheProP	roGluGlyVa	
CAGCATCTGG	AATCCTATCC	TACTCTGGCA	GCCCATCCCG	GTGCACACAG	450
lSerIleTrp	AsnProIleL	euLeuTrpGl	nProIlePro	ValHisThrV	
TTCTCTTTC	TGAAGATCAG	TTGCTATACC	TGCCTTTCAG	GAAGTGCCTT	500
alProLeuSe	rGluAspGln	LeuLeuTyrL	euProPheAr	gAsnCysPro	
CGTTTTCAAG	AACTTGAGAG	TGAGACTTTG	AAATCAGAGG	AATTCCAGAA	550
ArgPheGlnG	luLeuGluSe	rGluThrLeu	LysSerGluG	luPheGlnLy	
GAGGCTGCAC	CCTTATAAGG	ATTTTATAGC	TACCTTGGGA	AACTTTCAG	600
sArgLeuHis	ProTyrLysA	spPheIleAl	aThrLeuGly	LysLeuSerG	
GATTACATGG	CCAGGACCTT	TTTGGAATTT	GGAGTAAAGT	CTACGACCTT	650
lyLeuHisGl	yGlnAspLeu	PheGlyIleT	rpSerLysVa	lTyrAspPro	
TTATATTGTG	AGAGTGTTC	CAATTTCACT	TTACCTTCCT	GGGCCACTGA	700
LeuTyrCysG	luSerValHi	sAsnPheThr	LeuProSerT	rpAlaThrGl	
GGACACCATG	ACTAAGTTGA	GAGAATTGTC	AGAATGTGCC	CTCCTGTCCC	750
uAspThrMet	ThrLysLeuA	rgGluLeuSe	rGluLeuSer	LeuLeuSerL	
TCTATGGAAT	TCACAAGCAG	AAAGAGAAAT	CTAGGCTCCA	AGGGGGTGTC	800
euTyrGlyIl	eHisLysGln	LysGluLysS	erArgLeuGl	nGlyGlyVal	
CTGGTCAATG	AAATCCTCAA	TCACATGAAG	AGAGCAACTC	AGATACCAAG	850
LeuValAsnG	luIleLeuAs	nHisMetLys	ArgAlaThrG	lnIleProSe	
CTACAAAAAA	CTTATCATGT	ATTCTGCGCA	TGACACTACT	GTGAGTGGCC	900
rTyrLysLys	LeuIleMetT	yrSerAlaHi	sAspThrThr	ValSerGlyL	
TACAGATGGC	GCTAGATGTT	TACAACGGAC	TCCTTCCTCC	CTATGCTTCT	950
euGlnMetAl	aLeuAspVal	TyrAsnGlyL	euLeuProPr	oTyrAlaSer	
TGCCACTTGA	CGGAATTGTA	CTTTGAGAAG	GGGGAGTACT	TTGTGGAGAT	1000
CysHisLeuT	hrGluLeuTy	rPheGluLys	GlyGluTyrP	heValGluMe	
GTAATATCGG	AATGAGACGC	AGCACGAGCC	GTATCCCTTC	ATGCTACCTG	1050
tTyrTyrArg	AsnGluThrG	lnHisGluPr	oTyrProLeu	MetLeuProG	

Fig. 1A

```

GCTGCAGCCC TAGCTGTCCT CTGGAGAGGT TTGCTGAGCT GGTGGCCCT 1100
lyCysSerPr oSerCysPro LeuGluArgP heAlaGluLe uValGlyPro
GTGATCCCTC AAGACTGGTC CACGGAGTGT ATGACCACAA ACAGCCATCA 1150
ValIleProG lnAspTrpSe rThrGluCys MetThrThrA snSerHisGl
AGGTACTGAG GACAGTACAG ATGGATCGC ACCCGCCCGC TCGCCAGCC 1200
nGlyThrGlu AspSerThrA sp GlySerAl aProAlaArg SerProSerP
CCAGCACACA GCCCTGGGAG CATGTGAATG CCATCCAGGA GGCCCGGCGT 1250
roSerThrGl nProTrpGlu HisValAsnA laIleGlnGl uAlaArgArg
CTCCTGAACC TGAGTAGAGA CACTGCTGCT GAGATGAATG AAACAGTAGA 1300
LeuLeuAsnL euSerArgAs pThrAlaAla GluMetAsnG luThrValGl
AGTCATCTCA GAAATGTTTG ACCTCCAGGA GCCGACCTGC CTACAGACCC 1350
uValIleSer GluMetPheA spLeuGlnGl uProThrCys LeuGlnThrA
GCCTGGAGCT GTACAAGCAG GGCCTGCGGG GCAGCCTCAC CAAGCTCAAG 1400
rgLeuGluLe uTyrLysGln GlyLeuArgG lySerLeuTh rLysLeuLys
GGCCCCTTGA CCATGATGGC CAGCCACTAC AAACAGCACT GCCCTCCAAC 1450
GlyProLeuT hrMetMetAl aSerHisTyr LysGlnHisC ysProProTh
CCCGGAAACT TCCTGTGCAA CCCAGATTAT CACCTTTGAA AGTTTCAAAG 1500
rProGluThr SerCysAlaT hrGlnIleIl eThrPheGlu SerPheLysG
AGAACCTGAA GGACTTTCTG CTTGTATCC CTTTGTACTG CTGGGAGCCA 1550
luAsnLeuLy sAspPheLeu LeuValIleP roPheAspCy sTrpGluPro
GTCCAGGAGT GAGACCGGCC AGATGAGGCT GGCCAAGC 1588
ValGlnGlu. ..

```

Fig. 1B

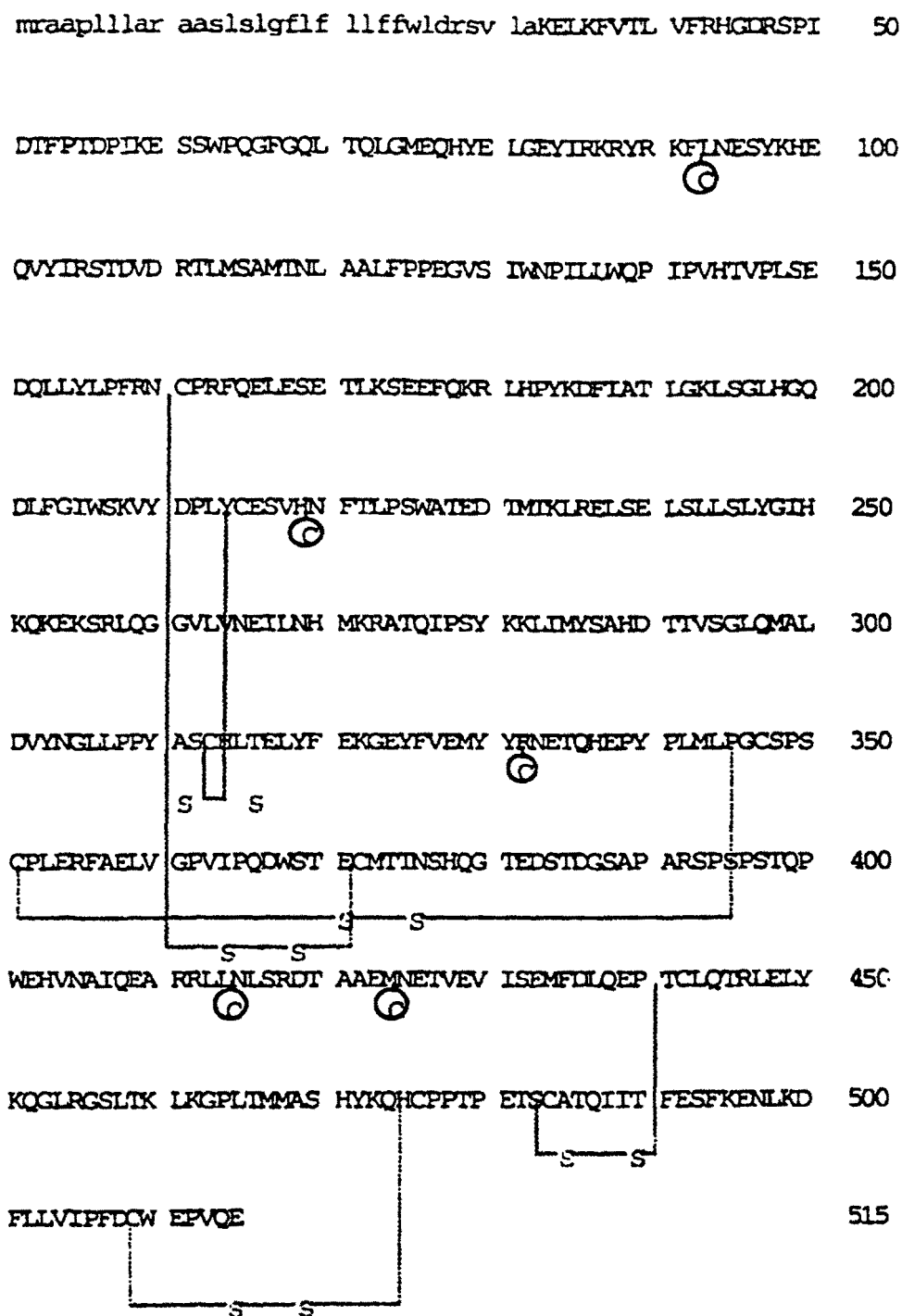


Fig. 2

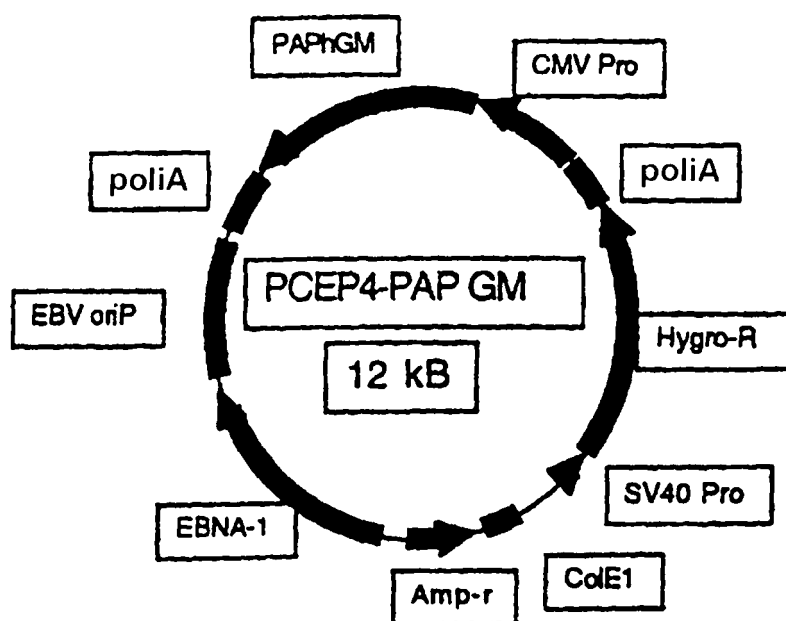


Fig. 3A

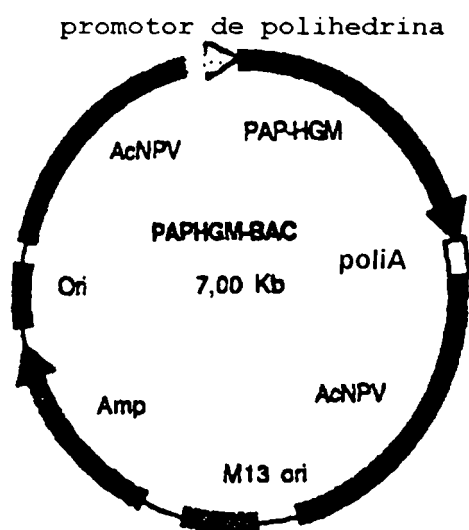


Fig. 3B

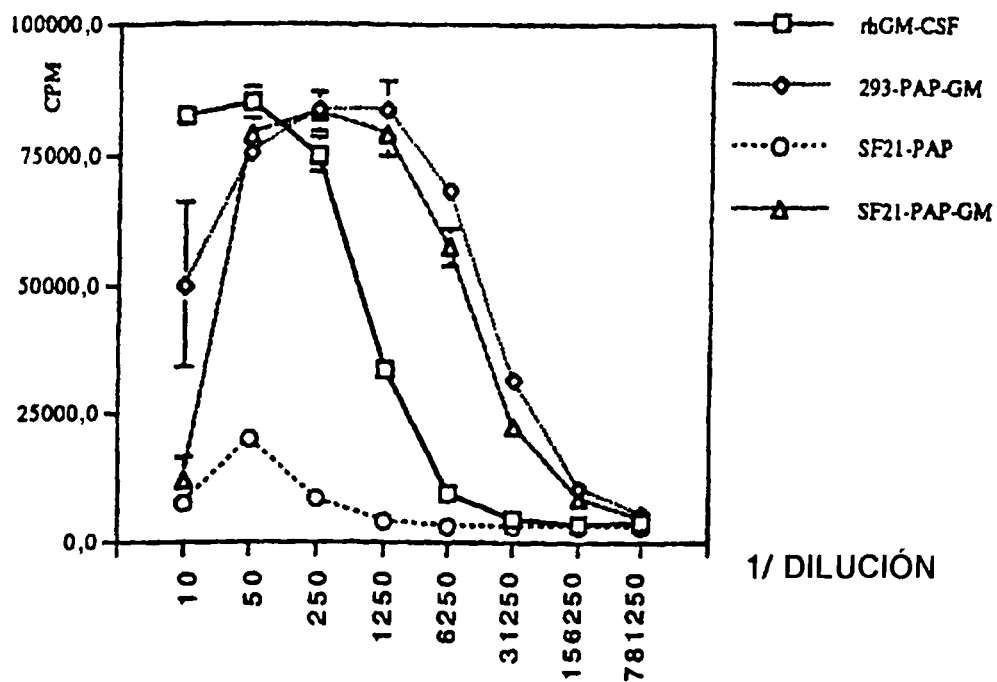


Fig. 4

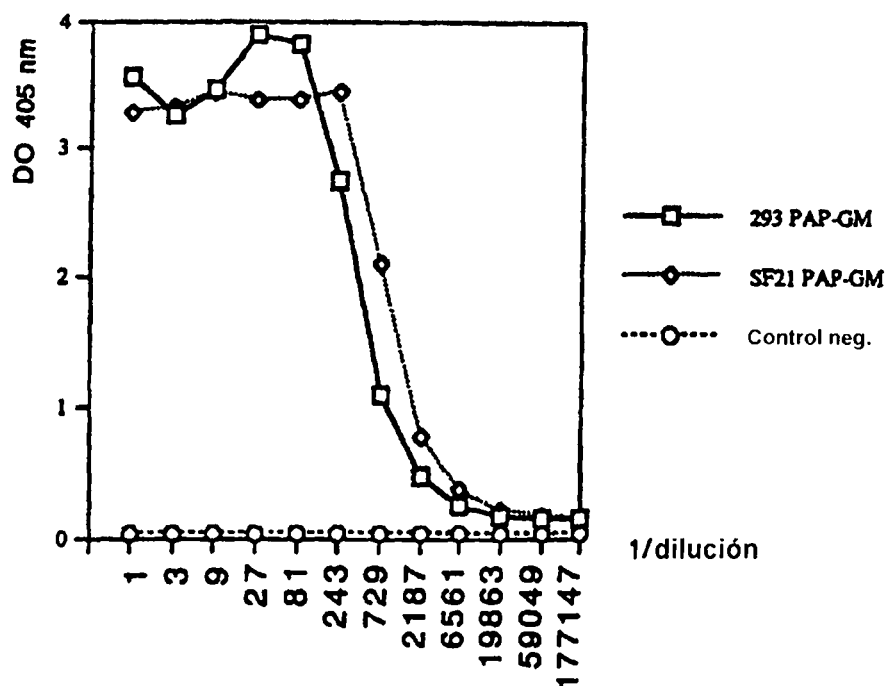


Fig. 5

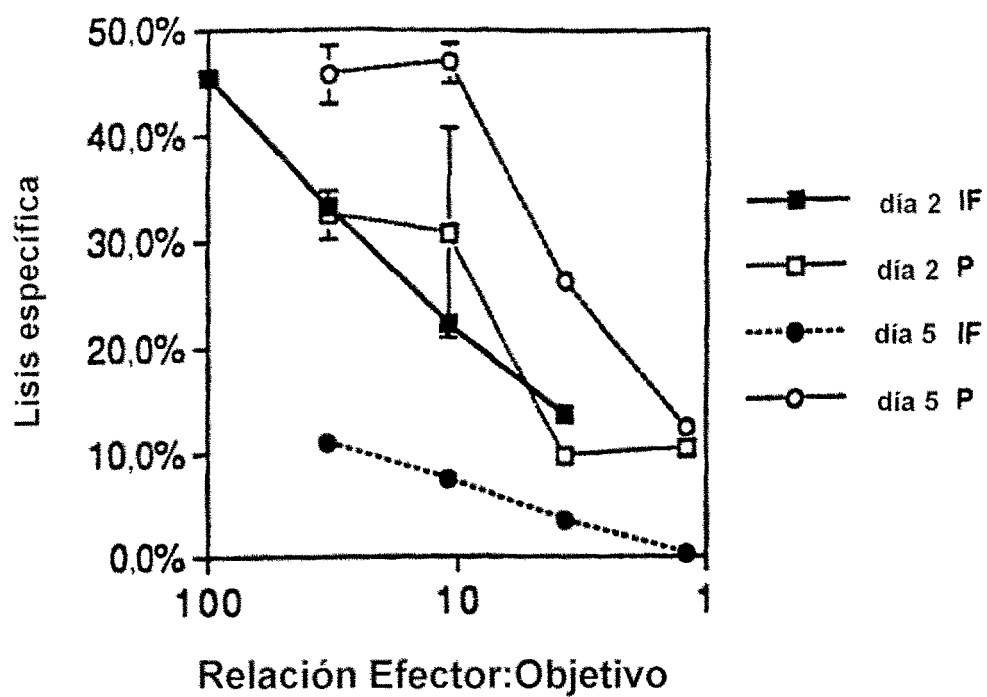


Fig. 6

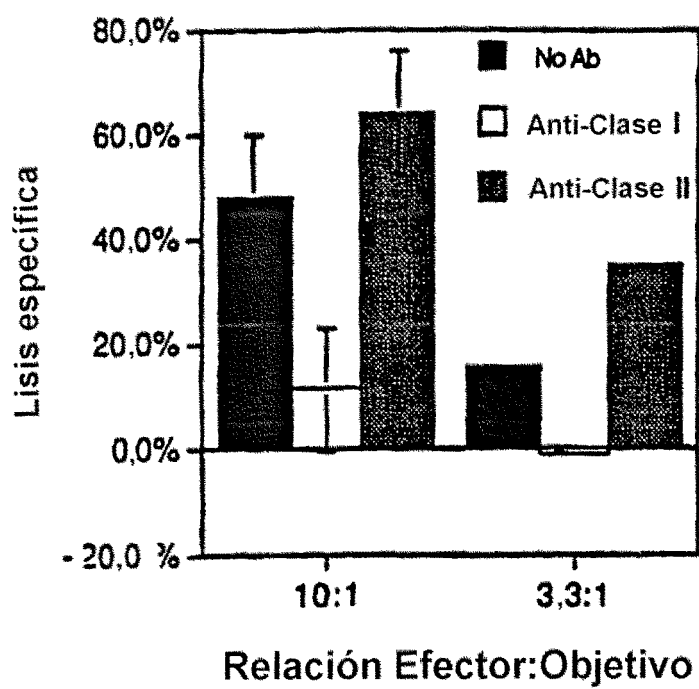


Fig. 7

AGTGAGCACC	ATGGAGCTGG	CGGCCTTGTC	CGCCTGGGG	CTCCTCTCG	CCCTCTTGCC	CCCCGGAGCC	GCGAG	75
MetGluLeuA	laAlaLeuCy	sArgTrpGly	LeuLeuLeuA	laLeuLeuPr	oProGlyAla	AlaSe		
CACCCAGTG	TGCACCGCA	CAGACATGAA	GCTGCGGCTC	CCTGCCAGTC	CCGAGACCCA	CCTGGACATG	CTCCG	150
rThrGlnVal	CysThrGlyT	hrAspMetLy	sLeuArgLeu	ProAlaSerP	roGluThrHi	sLeuAspMet	LeuAr	
CCACCTCTAC	CAGGCGTCC	AGGTGGTGCA	GGGAAACCTG	GAACCTACCT	ACCTGCCAC	CAATGCCAGC	CTGTC	225
gHisLeuTyr	GlnGlyCysG	lnValValGl	nGlyAsnLeu	GluLeuThrt	yrLeuProTh	rAsnAlaSer	LeuSe	
CTTCTGTCAG	GATATCCAGG	AGGTGCAGGG	CTACGTGCTC	ATCGCTCACA	ACCAAGTGAG	GCAGGTCCCA	CTGCA	300
rPheLeuGln	AspIleGlnG	luValGlnGl	yTyrValLeu	IleAlaHisA	snGlnValAr	gGlnValPro	LeuGl	
GAGGCTGCGG	ATGTGTGGAG	GCACCCAGCT	CTTTGAGGAC	AACTATGCCC	TGGCCGTGCT	AGACAATGGA	GACCC	375
nArgLeuArg	IleValArgG	lyThrGlnLe	uPheGluAsp	AsnTyrAlaL	euAlaValLe	uAspAsnGly	AspPr	
GCTGAACAAT	ACCACCCCTG	TCACAGGGGC	CTCCOCAGGA	GGCCTGCGGG	AGCTGCAGCT	TCGAAGCCTC	ACAGA	450
oLeuAsnAsn	ThrThrProV	alThrGlyAl	aSerProGly	GlyLeuArgG	luLeuGlnLe	uArgSerLeu	ThrGl	
GATCTTGAAA	GGAGGGGTCT	TGATCCAGCG	GAACCCCCAG	CTCTGCTACC	AGGACACGAT	TTTGTGGAG	GACAT	525
uIleLeuLys	GlyGlyValL	euIleGlnAr	gAsnProGln	LeuCysTyrG	lnAspThrIl	eLeuTrpLys	AspIl	
CTTCCACAAG	AACAACCAGC	TGGCTCTCAC	ACTGATAGAC	ACCAACCGCT	CTCGGGCCTG	CCACCCCTGT	TCTCC	600
ePheHisLys	AsnAsnGlnL	euAlaLeuTh	rLeuIleAsp	ThrAsnArgS	erArgAlaCy	sHisProCys	SerPr	
GATGTGTAAG	GGCTCCCGCT	GCTGGGGAGA	GAGTTCTGAG	GATTGTGAGA	GCCTGACGCG	CACGTGTCTGT	GCCGG	675
oMetCysLys	GlySerArgC	ysTrpGlyGl	uSerSerGlu	AspCysGlnS	erLeuThrAr	gThrValCys	AlaGl	
TGGCTGTGCC	CGCTGCAAGG	GGCCACTGCC	CACGTACTGC	TGCCATGAGC	AGTGTGCTGC	CGGCTGCACG	GGCCC	750
yGlyCysAla	ArgCysLysG	lyProLeuPr	oThrAspCys	CysHisGluG	lnCysAlaAl	aGlyCysThr	GlyPr	
CAAGCACTCT	GACTGCTCTG	CCTGCCCTCCA	CTTCAACCCAC	AGTGGCATCT	GTGAGCTGCA	CTGCCACGCC	CTGGT	825
oLysHisSer	AspCysLeuA	laCysLeuHi	sPheAsnHis	SerGlyIleC	ysGluLeuHi	sCysProAla	LeuVa	
CACCTACAAC	ACAGACACGT	TTGAGTCCAT	GCCCAATCCC	GAGGGCCGGT	ATACATTCGG	CGCCAGCTGT	GTGAC	900
lThrTyrAsn	ThrAspThrP	heGluSerMe	tProAsnPro	GluGlyArgT	yrThrPheGl	yAlaSerCys	ValTh	
TGCCTGTGCC	TACAACCTACC	TTTCTACGGA	CGTGGGATCC	TGCACCCCTG	TCTGCCCCCT	GCACAACCAA	GAGGT	975
rAlaCysPro	TyrAsnTyrL	euSerThrAs	pValGlySer	CysThrLeuV	alCysProLe	uHisAsnGln	GluVa	
GACAGCAGAG	GATGGACAC	AGCGGTGTGA	GAAGTGCAGC	AAGCCCTGTG	CCCGAGTGTG	CTATGGTCTG	GGCAT	1050
lThrAlaGlu	AspGlyThrG	lnArgCysGl	uLysCysSer	LysProCysA	laArgValCy	sTyrGlyLeu	GlyMe	
GGAGCACTTG	CGAGACGTGA	GGCAGATTAC	CAGTGCCCAAT	ATCCAGGAGT	TTGCTGGCTG	CAAGAAGATC	TTTGG	1125
tGluHisLeu	ArgGluValA	rgAlaValTh	rSerAlaAsn	IleGlnGluP	heAlaGlyCy	sLysLysIle	PheGl	
GAGCCTGGCA	TTTCTGCCGG	AGAGCTTTGA	TGGGGACCCA	GCCTCCAACA	CTGCCCCGCT	CCAGCCAGAG	CAGCT	1200
ySerLeuAla	PheLeuProG	luSerPheAs	pGlyAspPro	AlaSerAsnT	hrAlaProLe	uGlnProGlu	GlnLe	
CCAGTGTGTT	GAGACTCTGG	AAGAGATCAC	AGGTACCTTA	TACATCTCAG	CATGGCCGGA	CAGCCTGCCT	GACCT	1275
uGlnValPhe	GluThrLeuG	luGluIleTh	rGlyTyrLeu	TyrIleSerA	laTrpProAs	pSerLeuPro	AspLe	
CAGCGTCTTC	CAGAACCTGC	AAGTAATCCG	GGGACGAATT	CTGCACAATG	GCGCCTACTC	GCTGACCCCTG	CAAGG	1350
uSerValPhe	GlnAsnLeuG	lnValIleAr	gGlyArgIle	LeuHisAsnG	lyAlaTyrSe	rLeuThrLeu	GlnGl	
GCTGGGCATC	AGCTGGCTGG	GGCTGCCCTC	ACTGAGGGAA	CTGGGCAGTG	GACTGGCCCT	CATCCACCAT	AACAC	1425
yLeuGlyIle	SerTrpLeuG	lyLeuArgSe	rLeuArgGlu	LeuGlySerG	lyLeuAlaLe	uIleHisHis	AsnTh	
CCACCTCTGC	TTCTGTGACA	CGGTGCCCTG	GGACCAGCTC	TTTCGGAACC	CGCACCAAGC	TCTGCTCCAC	ACTGC	1500
rHisLeuCys	PheValHisT	hrValProTr	pAspGlnLeu	PheArgAsnP	roHisGlnAl	aLeuLeuHis	ThrAl	
CAACCGGCCA	GAGGACGAGT	GTGTGGGCGA	GGCCTGGGCC	TGCCACCAGC	TGTGCGGCGG	AGGGCACTGC	TGGGG	1575
aAsnArgPro	GluAspGluC	ysValGlyGl	uGlyLeuAla	CysHisGlnL	euCysAlaAr	gGlyHisCys	TrpGl	
TCCAGGGCCC	ACCCAGTGTC	TCAACTGCAG	CCAGTTCTTT	CGGGGCCAGG	AGTGCCTGGA	GGAAATGCCGA	GTAAT	1650
yProGlyPro	ThrGlnCysV	alAsnCysSe	rGlnPheLeu	ArgGlyGlnG	luCysValGl	uGluCysArg	ValLe	
GCAGGGGCTC	CCCAGGGAGT	ATGTGAATGC	CAGGCACCTG	TTGCCGTGCC	ACCCCTGAGT	TCAGCCCCAG	AATGG	1725
uGlnGlyLeu	ProArgGluT	yrValAsnAl	aArgHisCys	LeuProCysH	isProGluCy	sGlnProGln	AsnGl	
CTCAGTGACC	TGTTTGGAC	CGGAGGCTGA	CCAGTGTGTG	GCCTGTGCC	ACTATAAGGA	CCCTCCCTTC	TGCGT	1800
ySerValThr	CysPheGlyP	roGluAlaAs	pGlnCysVal	AlaCysAlaH	isTyrLysAs	pProProPhe	CysVa	

Fig. 8A

```

GGCCCCGCTGC CCCAGCGGTG TGAAACCTGA CCTCTCTTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC AGATGAGGAG GGCGC 1875
lAlaArgCys ProSerGlyV allysProAs pLeuSerTyr MetProIleT rPlysPhePr oAspGluGlu GlyAl
ATGCCAGCCT TCCCCATCA ACTGCACCCA CTCCTGTGTG GACCTGGATG ACAAGGGCTG CCCCCCGAG CAGAG 1950
aCysGlnPro CysProIleA snCysThrHi sSerCysVal AspLeuAspa sPlysGlyCy sProAlaGlu GlnAr
AGCCAGCCCT CTGACGTCC TCGAGGCACC CGCCCGCTCG CCCAGCCCA GCACACAGCC CTGGGAGCAT GTGAA 2025
gAlaSerPro LeuThrSerL euGluAlaPr oAlaArgSer ProSerProS erThrGlnPr oTrpGluHis ValAs
TGCCATCCAG GAGGCCCGGC GTCTCTTGAA CCTGAGTAGA GACACTGCTG CTGAGATGAA TGAAACAGTA GAAGT 2100
nAlaIleGln GluAlaArgA rgLeuLeuAs nLeuSerArg AspThrAlaA laGluMetAs nGluThrVal GluVa
CATCTCAGAA ATGTTTGACC TCCAGGAGCC GACCTGCCTA CAGACCCGCC TGGAGCTGTA CAAGCAGGGC CTGCG 2175
lIleSerGlu MetPheAspL euGlnGluPr oThrCysLeu GlnThrArgL euGluLeuTy rLysGlnGly LeuAr
GGCAGCCCTC ACCAAGCTCA AGGCCCCCTT GACCATGATG GCCAGCCACT ACAACAGCA CTGCCCTCCA ACCCC 2250
gGlySerLeu ThrLysLeuL ysGlyProLe uThrMetMet AlaSerHisT yrLysGlnHi sCysProPro ThrPr
GGAAACTTCC TGTGCAACCC AGATTATCAC CTTTGAAAGT TTCAAAGAGA ACCTGAAGGA CTTTCTGCTT GTCAT 2325
oGluThrSer CysAlaThrG lnIleIleTh rPheGluSer PheLysGluA snLeuLysAs pPheLeuLeu ValIl
CCCTTTGAC TGTGGGAGC CAGTCCAGGA GTGAGACCGG CCAGATGAGG CTGGCCAAGC 2385
eProPheAsp CysTrpGluP roValGlnGl u...

```

Fig. 8B

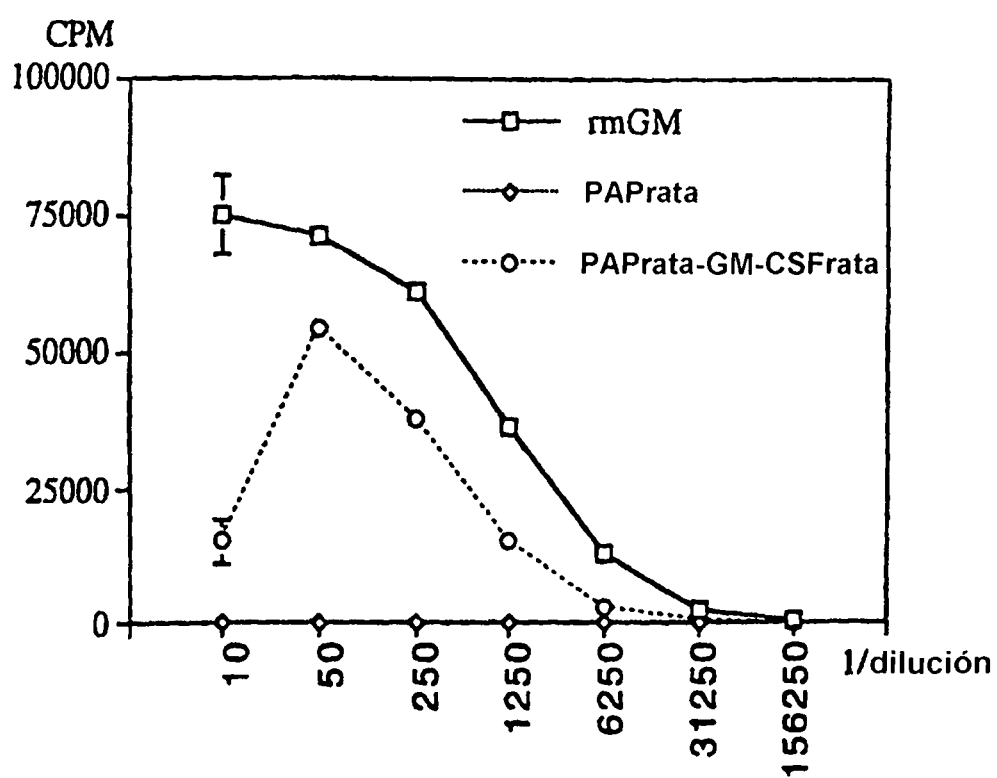


Fig. 9

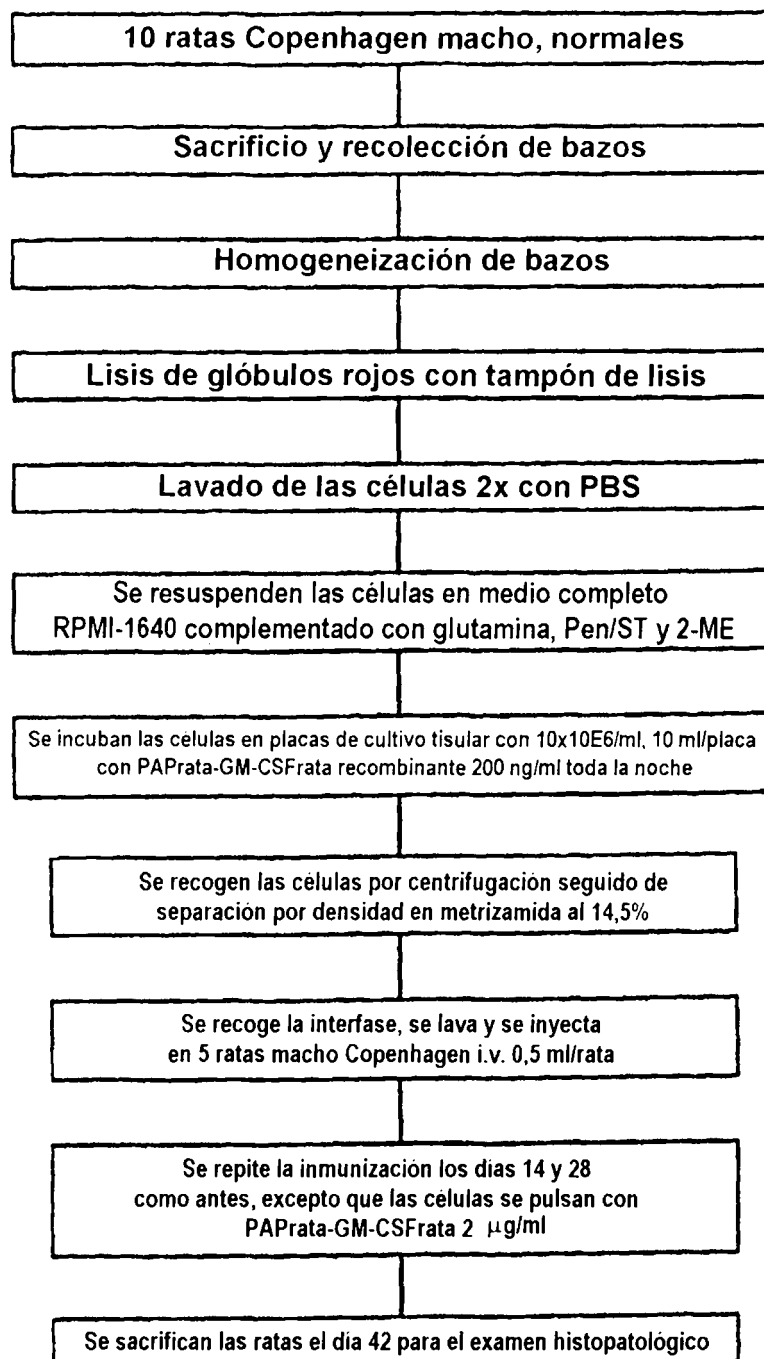


Fig. 10

TCACTGCCAT	GGAGGAGCGG	CAGTCAGATC	CTAGCGTGA	GCCCCCTCTG	AGTCAGGAAA	60
Me tGluGluPro	GlnSerAspP	roSerValGl	uProProLeu	SerGlnGluT		
CATTTTCAGA	CCTATGGAAA	CTACTTCCTG	AAAACAACGT	TCTGTCCCCC	TGCGGTGCC	120
hrPheSerAs	pLeuTrpLys	LeuLeuProG	luAsnAsnVa	lLeuSerPro	LeuProSerG	
AAGCAATGGA	TGATTTGATG	CTGTCCCCGG	ACCATATTGA	ACAATGGTTC	ACTGAAGACC	180
lnAlaMetAs	pAspLeuMet	LeuSerProA	spAspIleGl	uGlnTrpPhe	ThrGluAspP	
CAGGTCCAGA	TGAAGCTCCC	AGAATGCCAG	AGGCTGCTCC	CCCCGTGGCC	CCTGCACCAG	240
roGlyProAs	pGluAlaPro	ArgMetProG	luAlaAlaPr	oProValAla	ProAlaProA	
CAGCTOCTAC	ACCGGCGGCG	CCTGCACCAG	CCCCCTCCTG	GCCCCGTGCA	TCTTCTGTCC	300
laAlaProTh	rProAlaAla	ProAlaProA	laProSerTr	pProLeuSer	SerSerValP	
CTTCCAGAA	AACTAACCAG	GGCAGCTACG	GTTTCGGTCT	GGGCTTCTTG	CATTCTGGGA	360
roSerGlnLy	sThrTyrGln	GlySerTyrG	lyPheArgLe	uGlyPheLeu	HisSerGlyT	
CAGCAAGTC	TGTACTTGCC	ACGTACTCCC	CTGCCCTCAA	CAAGATGTTT	TGCCAACTGG	420
hrAlaLysSe	rValThrCys	ThrTyrSerP	roAlaLeuAs	nLysMetPhe	CysGlnLeuA	
CCAAGACCTG	CCCTGTGCAG	CTGTGGGTTC	ATTCCACACC	CCCCCCCCGC	ACCGCGGTCC	480
laLysThrCy	sProValGln	LeuTrpValA	spSerThrPr	oProProGly	ThrArgValA	
GCGCATGGC	CATCTACAAG	CAGTCACAGC	ACATGACGGA	GGTTGTGAGG	CGCTGCCCCC	540
rgAlaMetAl	aIleTyrLys	GlnSerGlnH	isMetThrGl	uValValArg	ArgCysProH	
ACCATGAGCG	CTGCTCAGAT	AGCGATGGTC	TGGCCCCCTC	TCAGCATCTT	ATCCGAGTGG	600
isHisGluAr	gCysSerAsp	SerAspGlyL	euAlaProPr	oGlnHisLeu	IleArgValG	
AAGGAAATTT	GCGTGTGGAG	TATTTGGATG	ACAGAAACAC	TTTTCGACAT	AGTGTGGTGG	660
luGlyAsnLe	uArgValGlu	TyrLeuAspA	spArgAsnTh	rPheArgHis	SerValValV	
TGCGCTATGA	GCGGCTGAG	GTTGGCTCTG	ACTGTACCAC	CATCCACTAC	AACTACATGT	720
alProTyrGl	uProProGlu	ValGlySerA	spCysThrTh	rIleHisTyr	AsnTyrMetC	
GTAACAGTTC	CTGCATGGGC	GCCATGAACC	GCAGGCCCAT	CCTCAACATC	ATCACACTGG	780
ysAsnSerSe	rCysMetGly	GlyMetAsnA	rgArgProIl	eLeuThrIle	IleThrLeuG	
AAGACTCCAG	TGGTAATCTA	CTGGGACGGA	ACAGCTTTGA	GGTGGGTGTT	TGTGGCTGTC	840
luAspSerSe	rGlyAsnLeu	LeuGlyArgA	snSerPheGl	uValArgVal	CysAlaCysP	
CTGGGAGAGA	CCGGCGCACA	GAGGAAGAGA	ATCTCCGCAA	GAAAGGGGAG	CCTCACCACG	900
roGlyArgAs	pArgArgThr	GluGluGluA	snLeuArgTy	sLysGlyGlu	ProHisHisG	
AGCTGCCCCC	AGGGAGCACT	AAGCGAGCAC	TGCCAACAA	CAOCAGCTCC	TCTCCCCAGC	960
luLeuProPr	oGlySerThr	LysArgAlaL	euProAsnAs	nThrSerSer	SerProGlnP	
CAAGAAGAA	ACCACTGGAT	CGAGAATATT	TCACCCCTCA	GATCCGTGGG	CGTGAGCGCT	1020
roLysLysLy	sProLeuAsp	GlyGluTyrP	heThrLeuGl	nIleArgGly	ArgGluArgP	
TGAGATGTT	CCGAGAGCTG	AATGAGGCGT	TGGAATCAA	GGATGCCCAG	GCTGGGAAGG	1080
heGluMetPh	eArgGluLeu	AsnGluAlaL	euGluLeuLy	sAspAlaGln	AlaGlyLysG	
AGCGGGGGG	GAGCAGGGCT	CACCTCAGCC	ACCTGAAGTC	CAAAAAGGGT	CAGTCTACCT	1140
luProGlyGl	ySerArgAla	HisSerSerH	isLeuLysSe	riLysLysGly	GlnSerThrS	
CCGCCATAA	AAAACATCAT	TTCAAGACAG	AAGGGCCCTG	CTCAGACTCT	AGTCCGCCAC	1200
erArgHisLy	sLysLeuMet	PheLysThrG	luGlyProAs	pSerAspSer	ArgSerAlaP	
CCGCGGCTC	GCCCGAGCCC	AGCACACAGC	CCTGGGAGCA	TGTGAATGCC	ATCCAGCGAG	1260
roAlaArgSe	rProSerPro	SerThrGlnP	roTrpGluHi	sValAsnAla	IleGlnGluA	
CCCGCGCTCT	CCTGAACCTG	AGTAGAGACA	CTGCTGCTGA	GATGAATGAA	ACAGTAGAAG	1320
laArgArgLe	uLeuAsnLeu	SerArgAspT	hrAlaAlaGl	uMetAsnGlu	ThrValGluV	
TCATCTCAGA	AATGTTTGAC	CTCCAGGAGC	CGACCTGCCT	ACAGACCCGC	CTGGAGCTGT	1380
alIleSerGl	uMetPheAsp	LeuGlnGluP	roThrCysLe	uGlnThrArg	LeuGluLeuT	
ACAAGCAGGG	CCTGGGGGGC	AGCCTCAACA	AGCTCAAGGG	CCCTTGACCT	ATGATGGCCA	1440
yrLysGlnGl	yLeuArgGly	SerLeuThrL	ysLeuLysGl	yProLeuThr	MetMetAlaS	
GCCACTACAA	ACAGCACTGC	CCTCCAACCC	CGGAAACTTC	CTGTGCAACC	CAGATTATCA	1500
erHisTyrLy	sGlnHisCys	ProProThrP	roGluThrSe	rCysAlaThr	GlnIleIleT	
CCTTTGAAAG	TTTCAAGAG	AACTGAAGG	ACTTTCCTCT	TGTCAATCCC	TTTGACTGCT	1560
hrPheGluSe	rPheLysGlu	AsnLeuLysA	spPheLeuLe	uValIlePro	PheAspCysT	
GGGAGCCAGT	CCAGGAGATG	AGAGGATGCG	ATCAACATCA	CCATCACTGA		1610
rpGluProVa	lGlnGluMet	ArgGlySerH	isHisHisHi	sHisHis...		

Fig. 11

MEEPQSDPSV	EPPLSQETFS	DLWKLLPENN	VLSPPLSQAM	DDLMLSPDDI	50
EQWFTEDPGP	DEAPRMPEAA	PFVAPAPAAP	TPAAPAPAPS	WPLSSSVPSQ	100
KTYQGSYGFR	LGFLHSGTAK	SVTCTYSPAL	NKMFCQLAKT	CPVQLWVDST	150
PPPGTRVRAM	AIYKQSQHMT	EVVRRCPHHE	RCSDSDGLAP	PQHLIRVEGN	200
LRVEYLDDRN	TFRHSVVVPY	EPPEVGSDCT	TIHYNMCNS	SCMGGMNRRP	250
ILTIITLEDs	SGNLLGRNSF	EVRVCACPGR	DRRTEENLR	KKGEPHHELP	300
PGSTKRALPN	NTSSSPQPKK	KPLDGEYFTL	QIRGRERFEM	FRELNEALEL	350
KDAQAGKEPG	GSRAHSSHLK	SKKGQSTSRH	KKLMFKTEGP	DSDGHSAPAR	400
SPSPSTQPWE	HVNAIQEARR	LLNLSRDTAA	EMNETVEVIS	EMFDLQEPTC	450
LQTRLELYKQ	GLRGS�TKLK	GPLTMMASHY	KQHCPTPET	SCATQIITFE	500
SFKENLKDFL	LVIPFDCWEP	VQEMRGSHHH	HHH		533

Fig. 12

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- (i) SOLICITANTE: ACTIVATED CELL THERAPY, INC.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Composición y procedimiento inmunoestimuladores
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 8
- (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DIRECCIÓN: Dehlinger & Associates
- (B) CALLE: P.O. Box 60850
- (C) CIUDAD: Palo Alto
- (D) ESTADO: CA
- (E) PAÍS: EE.UU.
- (F) CÓDIGO: 94306
- (v) FORMA DE LECTURA EN ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: disco flexible
- (B) ORDENADOR: PC compatible IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, Versión nº 1.25
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US96/20241
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23-DIC-1996
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/579.823
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 28-DIC-1995
- (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Stratford, Carol A.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 34.444
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 7636-0010.41
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: 415-324-0880
- (B) TELEFAX: 415-324-0960

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1588 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

ES 2 281 087 T3

(C) AISLADO PARTICULAR: gen de fusión de fosfatasa ácida prostática-GM-CSF; Fig. 1

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: carcinoma de próstata LnCaP.FGC; PBMC

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 1:

	CGGCTCTCCT CAACATGAGA GCTGCACCCC TCCTCCTGGC CAGGGCAGCA AGCCTTAGCC	60
10	TTGGCTTCTT GTTCTGCTT TTTTCTGGC TAGACCGAAG TGTACTAGCC AAGGAGTTGA	120
	AGTTTGTGAC TTTGGTGTTC CGGCATGGAG ACCGAAGTCC CATTGACACC TTTCCCCTG	180
15	ACCCCATAAA GGAATCCTCA TGGCCACAAG GATTGGCCA ACTCACCAG CTGGGCATGG	240
	AGCAGCATTA TGAAGTGGG GAGTATATAA GAAAGAGATA TAGAAAATTC TTGAATGAGT	300
	CCTATAAACA TGAACAGGTT TATATTCGAA GCACAGACGT TGACCGGACT TTGATGAGTG	360
20	CTATGACAAA CCTGGCAGCC CTGTTTCCCC CAGAAGGTGT CAGCATCTGG AATCCTATCC	420
	TACTCTGGCA GCCCATCCCG GTGCACACAG TTCCTCTTC TGAAGATCAG TTGCTATACC	480
	TGCCTTTCAG GAACTGCCCT CGTTTTCAAG AACTTGAGAG TGAGACTTTG AAATCAGAGG	540
25	AATCCAGAA GAGGCTGCAC CTTATAAGG ATTTTATAGC TACCTTGGGA AAACCTTCAG	600
	GATTACATGG CCAGGACCTT TTTGGAATTT GGAGTAAAGT CTACGACCCT TTATATTGTG	660
	AGAGTGTTCA CAATTTCACT TTACCCTCCT GGGCCACTGA GGACACCATG ACTAAGTTGA	720
30	GAGAATTGTC AGAATTGTCC CTCCTGTCCC TCTATGGAAT TCACAAGCAG AAAGAGAAAT	780
	CTAGGCTCCA AGGGGGTGTC CTGGTCAATG AAATCCTCAA TCACATGAAG AGAGCAACTC	840
35	AGATACCAAG CTACAAAAAA CTTATCATGT ATTCTGCGCA TGACACTACT GTGAGTGGCC	900
	TACAGATGGC GCTAGATGTT TACAACGGAC TCCTTCCTCC CTATGCTTCT TGCCACTTGA	960
	CGGAATTGTA CTTTGAGAAG GGGGAGTACT TTGTGGAGAT GTACTATCGG AATGAGACGC	1020
40	AGCACGAGCC GTATCCCCTC ATGCTACCTG GCTGCAGCCC TAGCTGTCCT CTGGAGAGGT	1080
	TTGCTGAGCT GGTGGCCCT GTGATCCCTC AAGACTGGTC CACGGAGTGT ATGACCACAA	1140
	ACAGCCATCA AGGTACTGAG GACAGTACAG ATGGATCCGC ACCCGCCCGC TCGCCAGCC	1200
45	CCAGCACACA GCCCTGGGAG CATGTGAATG CCATCCAGGA GGCCCGGCGT CTCCTGAACC	1260
	TGAGTAGAGA CACTGCTGCT GAGATGAATG AAACAGTAGA AGTCATCTCA GAAATGTTTG	1320
	ACCTCCAGGA GCCGACCTGC CTACAGACCC GCCTGGAGCT GTACAAGCAG GGCCTGCGGG	1380
50	GCAGCCTCAC CAAGCTCAAG GGCCCTTGA CCATGATGGC CAGCCACTAC AAACAGCACT	1440
	GGCCCTCAAC CCCGGAACT TCCTGTGCAA CCCAGATTAT CACCTTTGAA AGTTTCAAAG	1500
55	AGAACCTGAA GGACTTTCTG CTTGTCATCC CCTTTGACTG CTGGGAGCCA GTCCAGGAGT	1560
	GAGACCGGCC AGATGAGGCT GGCCAAGC	1588

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 515 aminoácidos

65 (B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(C) AISLADO PARTICULAR: proteína de fusión de fosfatasa ácida prostática-GM-CSF; Fig. 1

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 2:

```

Met Arg Ala Ala Pro Leu Leu Leu Ala Arg Ala Ala Ser Leu Ser Leu
1      5      10      15
Gly Phe Leu Phe Leu Leu Phe Phe Trp Leu Asp Arg Ser Val Leu Ala
20      25      30
Lys Glu Leu Lys Phe Val Thr Leu Val Phe Arg His Gly Asp Arg Ser
35      40      45
Pro Ile Asp Thr Phe Pro Thr Asp Pro Ile Lys Glu Ser Ser Trp Pro
50      55      60
Gln Gly Phe Gly Gln Leu Thr Gln Leu Gly Met Glu Gln His Tyr Glu
65      70      75      80
Leu Gly Glu Tyr Ile Arg Lys Arg Tyr Arg Lys Phe Leu Asn Glu Ser
85      90      95
Tyr Lys His Glu Gln Val Tyr Ile Arg Ser Thr Asp Val Asp Arg Thr
100     105     110
Leu Met Ser Ala Met Thr Asn Leu Ala Ala Leu Phe Pro Pro Glu Gly
115     120     125
Val Ser Ile Trp Asn Pro Ile Leu Leu Trp Gln Pro Ile Pro Val His
130     135     140
Thr Val Pro Leu Ser Glu Asp Gln Leu Leu Tyr Leu Pro Phe Arg Asn
145     150     155     160
Cys Pro Arg Phe Gln Glu Leu Glu Ser Glu Thr Leu Lys Ser Glu Glu
165     170     175
Phe Gln Lys Arg Leu His Pro Tyr Lys Asp Phe Ile Ala Thr Leu Gly
180     185     190
Lys Leu Ser Gly Leu His Gly Gln Asp Leu Phe Gly Ile Trp Ser Lys
195     200     205
Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Cys Glu Ser Val His Asn Phe Thr Leu Pro
210     215     220
Ser Trp Ala Thr Glu Asp Thr Met Thr Lys Leu Arg Glu Leu Ser Glu
225     230     235     240
Leu Ser Leu Leu Ser Leu Tyr Gly Ile His Lys Gln Lys Glu Lys Ser
245     250     255
Arg Leu Gln Gly Gly Val Leu Val Asn Glu Ile Leu Asn His Met Lys
260     265     270
Arg Ala Thr Gln Ile Pro Ser Tyr Lys Lys Leu Ile Met Tyr Ser Ala
275     280     285
His Asp Thr Thr Val Ser Gly Leu Gln Met Ala Leu Asp Val Tyr Asn
290     295     300
Gly Leu Leu Pro Pro Tyr Ala Ser Cys His Leu Thr Glu Leu Tyr Phe
305     310     315     320
Glu Lys Gly Glu Tyr Phe Val Glu Met Tyr Tyr Arg Asn Glu Thr Gln

```

[illegible]

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 3:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 2385 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 45 (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 50 (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 55 (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*
- (C) AISLADO PARTICULAR: gen de fusión de GM-CSF-HER-2; Fig. 8
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 3:
- 60 AGTGAGCACC ATGGAGCTGG CGGCCTTGTG CCGCTGGGGG CTCCTCCTCG CCCTCTTGCC 60
- CCCCGGAGCC GCGAGCACCC AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC 120
- CAGTCCCGAG ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA 180
- 65 GGGAAACCTG GAACTCACCT ACCTGCCCAC CAATGCCAGC CTGTCCTTCC TGCAGGATAT 240

ES 2 281 087 T3

	CCAGGAGGTG CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA GTGAGGCAGG TCCCACTGCA	300
	GAGGCTGCGG ATTGTGCGAG GCACCCAGCT CTTTGAGGAC AACTATGCCC TGGCCGTGCT	360
5	AGACAATGGA GACCCGCTGA ACAATACCAC CCCTGTCA CA GGGGCCTCCC CAGGAGGCCT	420
	GCGGGAGCTG CAGCTTCGAA GCCTCACAGA GATCTTGAAA GGAGGGGTCT TGATCCAGCG	480
10	GAACCCCCAG CTCTGCTACC AGGACACGAT TTTGTGGAAG GACATCTTCC ACAAGAACAA	540
	CCAGCTGGCT CTCACACTGA TAGACACCAA CCGCTCTCGG GCCTGCCACC CCTGTTCTCC	600
	GATGTGTAAG GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGCG	660
15	CACTGTCTGT GCCGGTGGCT GTGCCCGCTG CAAGGGGCCA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA	720
	TGAGCAGTGT GCTGCCGGCT GCACGGGCCC CAAGCACTCT GACTGCCTGG CCTGCCTCCA	780
	CTTCAACCAC AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA	840
20	CACGTTTGAG TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA TTCGGCGCCA GCTGTGTGAC	900
	TGCCTGTCCC TACAACCTACC TTTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCCTCG TCTGCCCCCT	960
	GCACAACCAA GAGGTGACAG CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC	1020
25	CTGTGCCCCG GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC	1080
	CAGTGCCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTCT	1140
30	GCCGGAGAGC TTTGATGGGG ACCCAGCCTC CAACACTGCC CCGCTCCAGC CAGAGCAGCT	1200
	CCAAGTGTTT GAGACTCTGG AAGAGATCAC AGGTTACCTA TACATCTCAG CATGGCCGGA	1260
	CAGCCTGCCT GACCTCAGCG TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGGAC GAATTCTGCA	1320
35	CAATGGCGCC TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC	1380
	ACTGAGGGAA CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT	1440
	GCACACGGTG CCCTGGGACC AGCTCTTTCC GAACCGCAC CAAGCTCTGC TCCACACTGC	1500
40	CAACCGGCCA GAGGACGAGT GTGTGGGCGA GGGCTGGCC TGCCACCAGC TGTGCGCCCC	1560
	AGGGCACTGC TGGGGTCCAG GGCCACCCA GTGTGTCAAC TGCAGCCAGT TCCTTCGGGG	1620
	CCAGGAGTGC GTGGAGGAAT GCCGAGTACT GCAGGGGCTC CCCAGGGAGT ATGTGAATGC	1680
45	CAGGCACTGT TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT	1740
	TGGACCGGAG GCTGACCAGT GTGTGGCCTG TGCCCACTAT AAGGACCCTC CCTTCTGCGT	1800
50	GGCCCGCTGC CCCAGCGGTG TGAAACCTGA CCTCTCCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC	1860
	AGATGAGGAG GGCGCATGCC AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT	1920
	GGATGACAAG GGCTGCCCCG CCGAGCAGAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCC TCGAGGCACC	1980
55	CGCCCGCTCG CCCAGCCCCA GCACACAGCC CTGGGAGCAT GTGAATGCCA TCCAGGAGGC	2040
	CCGGCGTCTC CTGAACCTGA GTAGAGACAC TGCTGCTGAG ATGAATGAAA CAGTAGAAGT	2100
60	CATCTCAGAA ATGTTTGACC TCCAGGAGCC GACCTGCCTA CAGACCCGCC TGGAGCTGTA	2160
	CAAGCAGGGC CTGCGGGGCA GCCTCACCAA GCTCAAGGGC CCCTTGACCA TGATGGCCAG	2220
65	CCACTACAAA CAGCACTGCC CTCCAACCCC GGAACTTCC TGTGCAACCC AGATTATCAC	2280

ES 2 281 087 T3

CTTTGAAAGT TTCAAAGAGA ACCTGAAGGA CTTTCTGCTT GTCATCCCCT TTGACTGCTG 2340
GGAGCCAGTC CAGGAGTGAG ACCGGCCAGA TGAGGCTGGC CAAGC 2385

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 782 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

20

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(C) AISLADO PARTICULAR: proteína de fusión de GM-CSF-Her-2; Fig. 8

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 4:

25

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20 25 30

30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60

35

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

40

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

45

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

50

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

55

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

60

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235 240

65

ES 2 281 087 T3

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255
 5 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270
 Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
 275 280 285
 10 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320
 15 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350
 20 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 25 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 30 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430
 35 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460
 40 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495
 45 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 50 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560
 55 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575
 60 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu

ES 2 281 087 T3

	595	600	605
5	Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln 610 615 620		
	Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys 625 630 635 640		
10	Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Leu Glu Ala 645 650 655		
	Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn 660 665 670		
15	Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala 675 680 685		
	Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp Leu 690 695 700		
20	Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly 705 710 715 720		
	Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala 725 730 735		
25	Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala 740 745 750		
	Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe 755 760 765		
30	Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu 770 775 780		

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

50 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(C) AISLADO PARTICULAR: cebador oligonucleótido sintético para PAP

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC Nº: 5:

CGGCTCTCCT CAACATGAGA GC

22

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 281 087 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(C) AISLADO PARTICULAR: cebador oligonucleótido sintético para PAP humano

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 6:

CACAGGATCC ATCTGTACTG TCCTCAGTAC C

31

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(C) AISLADO PARTICULAR: cebador oligonucleótido sintético para GM-CSF humano

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 7:

GACTGGATCC GCACCCGCCC GCTCGCCC

28

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(C) AISLADO PARTICULAR: cebador oligonucleótido sintético para GM-CSF humano

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID SEC N°: 8:

GATCTCTAGA GCTTGCCAG CCTCATCTGG

30