

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organizacion CSA Ltda

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

0052321

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO VACUNA Cambio de Título:
DERIVADOS DE LA PROSTASA PARA VACUNAS
ANTICANCEROSAS.

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL AGIK ³⁸/₄₈, AGIK ³⁵/₄₈, AGIK ⁴⁵/₀₅
007K ¹⁹/₀₀, C12N ¹⁵/₀₉.

71. SOLICITANTE SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. - CORIXA CORPORATION

DOMICILIO RIDENSART, BELGICA - SEATTLE, WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO GERMAN CASTILLO GRAU

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C. 12 - Julio de 2000.

202099.

originalidad en 00111



REPUBLICA DE COLOMBIA



SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA
Y COMERCIO



00 52321

CITUD

ENTE

ENCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
CORIXA CORPORATION

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

GERMAN CASTILLO GRAU

País de Domicilio

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Departamento o Estado

BELGICA - WASHINGTON

Dirección

Ciudad

RIXENSART - SEATTLE

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO PODER No.16.769-PODER No.19.663

Nombre

GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección y Domicilio

Carrera 13 No.37-43, Piso 12

Ciudad

Santafé de Bogotá

Teléfono

2857460

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Teresa CABEZON SILVA

Davin Clifford DILLON

Identificación

Dirección

Rixensart, Bélgica

Seattle, Washington, Estados Unidos

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

(VACUNA)

Cambio de Título:

DERIVADOS DE LA PROSTASA PARA VACUNAS ANTICANCER
ROSAS.

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☐

(33) País

E.U.A.

(32) Fecha

Julio 13/99

(31) No. Solicitud

09/352.616

E.U.A.

Nov. 12/99

09/439.313

E.U.A.

Nov. 18/99

09/443686

Fuente: Convención de París.

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☐ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K38/48, A61K35/48, A61K45/05
C07K19/00, C12N15/09

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Departamento o Estado

Dirección

Ciudad

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

Dirección y Domicilio

Ciudad

Teléfono

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Identificación

Dirección

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☐

(33) País

☒ E.U.A.

☒ E.U.A.

☒ E.U.A.

☒ E.U.A.

(32) Fecha

Enero 14/00

Marzo 27/00

Mayo 9/00

Mayo 12/00

(31) No. Solicitud

09/483.672

09/536.857

No se conoce aún

No se conoce aún

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☐ 18 meses

a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL



REPUBLICA DE COLOMBIA



SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA
Y COMERCIO

SOLICITUD DE
PATENTE DE
INVENCION

3

17

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Departamento o Estado

Dirección

Ciudad

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

Dirección y Domicilio

Ciudad

Teléfono

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Identificación

Dirección

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☐

(33) País E.U.A.
E.U.A.
INGLESA

(32) Fecha Junio 13/00
Junio 27/00
Junio 27/00

(31) No. Solicitud
09/605783

09/593793
No se conoce aún
No se conoce aún
0015747.9

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☐ 18 meses

a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevas proteínas de la familia de las prostasas y a su producción. En particular, la invención se refiere a una proteína prostasa, o a un fragmento de la misma, fusionada a un acompañante de fusión inmunológico, como la proteína NS1. Dichos antígenos se pueden formular para proporcionar vacunas para el tratamiento de tumores de la próstata. También se proporcionan nuevos métodos para purificar la proteína prostasa y homólogos de la misma.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|--|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☒ |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC | ☒ |
| Recibo de la tasa respectiva | ☒ |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Andina: | |
| Copia de la primera solicitud | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Unionista: | |
| Copia certificada de la primera solicitud: | ☒ |
| Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior | |
| Traducción simple | ☒ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios | ☒ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietarios según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☒ |
| Extracto para publicación según formato | ☒ |
| Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms | ☐ |
| Otros Documentos | ☐ |

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE GERMAN CASTILLO GRAU

CC. 17.017.671 Btá

T.P.No. 2978

38

VACUNA

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a derivados proteínicos de una proteína conocida como prostasa, una serina proteasa
5 específica de la próstata, a métodos para su purificación y fabricación y también a composiciones farmacéuticas que contienen dichos derivados y a su uso en medicina. En particular, dichos derivados encuentran utilidad en terapia de vacuna contra el cáncer, particularmente en terapia de vacuna
10 contra el cáncer de próstata y como agentes de diagnóstico de tumores de próstata.

En particular, los derivados de la invención incluyen proteínas de fusión que comprenden prostasa unida a un
acompañante de fusión inmunológico o a un acompañante
15 intensificador de la expresión.

La presente invención proporciona también métodos para purificar los derivados de la prostasa y para formular vacunas para tratar inmunoterapéuticamente pacientes con cáncer de
próstata y tumores que expresan prostasa distintos de tumores de
20 la próstata, hiperplasia prostática y neoplasia intraepitelial de la próstata (PIN).

El cáncer de próstata es el cáncer más común en los hombres, con un índice estimado de incidencia del 30% en hombres mayores de 50 años. Hay una evidencia clínica aplastante de que
25 el cáncer humano de próstata tiene tendencia a extenderse (metástasis) a los huesos y parece que la enfermedad progresa inevitablemente desde un estado dependiente de los andrógenos a un estado refractario a los andrógenos, originando una

mortalidad incrementada de los pacientes [F. Abbas y P. Scardino, "The Natural History of Clinical Prostate Carcinoma", *Cancer*, 80, 827-833 (1997)]. Esta enfermedad prevalente es actualmente la segunda causa de muerte por cáncer entre los

5 hombres en los Estados Unidos.

A pesar de investigaciones considerables en terapias para esta enfermedad, el cáncer de próstata sigue siendo difícil de tratar. Actualmente, el tratamiento se basa en cirugía y radioterapia, pero estos métodos son ineficaces en un porcentaje

10 significativo de casos [M. Frydenberg, P. Stricker y K. Kaye, "Prostate Cancer Diagnosis and Management", *The Lancet*, 349, 1.681-1.687 (1997)]. Actualmente se conocen varios antígenos asociados a tumores. Muchos de estos antígenos pueden ser

15 objetivos de interés en inmunoterapia, pero no son totalmente específicos de tumores o están muy relacionados con proteínas normales y, por lo tanto, tienen el riesgo de autoinmunidad específica de los órganos, una vez atacados por una respuesta

20 inmunitaria potente. Cuando puede ser tolerada una respuesta autoinmunitaria a órganos no cruciales, la autoinmunidad al corazón, intestino y otros órganos cruciales puede originar

25 perfiles de inocuidad inaceptables. Algunas proteínas prostáticas específicas identificadas anteriormente, como antígeno específico prostático (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno de membrana específico prostático (PSMA) y

antígeno de células prostáticas pluripotenciales (PSCA) tienen un potencial terapéutico limitado y, además, no siempre relacionado con la presencia de cáncer de próstata o con el nivel de metástasis [C. Pound, A. Partin, M. Eisenberg et al., "Natural

7

History of Progression after PSA Elevation following Radical Prostatectomy",

JAMA, 281, 1.591-1.597 (1999), y D. Bostwick, A. Pacelli, M. Blute et al., "Prostate Specific Membrane Antigen Expression in Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Adenocarcinoma, Cancer, 82, 2.256-2.261 (1998)].

La existencia de mecanismos de rechazo de tumores está admitida desde hace varias décadas. Los antígenos tumorales, aunque codificados por el genoma del organismo y, por lo tanto, no reconocidos por el sistema inmune mediante el fenómeno de inmunotolerancia, pueden inducir ocasionalmente respuestas detectables en pacientes con cáncer. Esto se pone de manifiesto por respuestas de anticuerpos o de linfocitos T a antígenos expresados por el tumor [B.H. Xue, Y. Zhang, J. Sosman et al., "Induction of Human Cytotoxic T-Lymphocytes Specific for Prostate-Specific Antigen", Prostate, 30 (2), 73-78 (1997)]. Cuando se pueden observar efectos antitumorales relativamente débiles por administración de anticuerpos que reconocen marcadores superficiales de células tumorales, la inducción de fuertes respuestas de linfocitos T a antígenos expresados por células tumorales puede originar una regresión completa de tumores creados en modelos animales (principalmente murinos).

Actualmente está admitido que la expresión de antígenos tumorales por una célula no es suficiente para la inducción de una respuesta inmunitaria a estos antígenos. La iniciación de una respuesta de rechazo a un tumor requiere una serie de fenómenos de inmunoamplificación dependientes de la intervención de células antigénicas presentes, responsables del aporte de una

9

serie de señales de activación.

La prostasa es una serina proteasa específica de la próstata (similar a la tripsina), con una longitud de 254 aminoácidos, con una tríada catalítica conservada de la serina proteasa H-D-S y una secuencia de prepropéptidos aminoterminales, que indica una función secretora potencial [P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Gelinas, L. Hood y K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3.114-3.119 (1999)]. Se ha descrito un supuesto sitio de glucosilación. La estructura prevista es muy similar a la de otras serina proteasas conocidas, mostrando que el polipéptido maduro se pliega en un único dominio. La proteína madura tiene una longitud de 224 aminoácidos, demostrando un epítipo A2 que se procesa de modo natural.

La secuencia de nucleótidos de la prostasa y la secuencia deducida de polipéptidos y de sus homólogos se describen en Ferguson et al. [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3.114-3.119 (1999)] y en las solicitudes de patentes internacionales nos. WO 98/12302 (y también en la correspondiente patente de los Estados Unidos 5.955.306), WO 98/20117 (y también en las correspondientes patentes de los Estados Unidos 5.840.871 y 5.786.148) (calicreína específica prostática) y WO 00/04149 (P703P).

La presente invención proporciona fusiones de proteínas prostasas basadas en proteínas prostasas y en fragmentos y homólogos de las mismas ("derivados"). Dichos derivados son

9/10

adecuados para su uso en formulaciones de vacunas terapéuticas que son adecuadas para el tratamiento de tumores de la próstata.

Los fragmentos de prostasas de la invención serán de por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos, 5 preferiblemente de aproximadamente 20, más preferiblemente de aproximadamente 50, más preferiblemente de aproximadamente 100, más preferiblemente de aproximadamente 150 aminoácidos contiguos seleccionados de las secuencias de aminoácidos indicadas en la SEQ ID N° 7 y en la SEQ ID N° 8. Más particularmente, los 10 fragmentos conservarán alguna propiedad funcional, preferiblemente una actividad inmunológica, de la molécula mayor indicada en la SEQ ID N° 7 o en la SEQ ID N° 8, y son útiles en los métodos descritos en la presente Memoria (por ejemplo, en composiciones de vacunas, en diagnósticos, etc.). En particular, 15 los fragmentos pueden generar una respuesta inmunitaria cuando se unen adecuadamente a un portador, que reconocerá la proteína de la SEQ ID N° 7 o de la SEQ ID N° 8.

Los homólogos de prostasas compartirán generalmente una similitud sustancial de secuencias e incluyen polipéptidos 20 aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de por lo menos 70%, preferiblemente una identidad de por lo menos 80%, más preferiblemente una identidad de por lo menos 90%, aún más preferiblemente una identidad de por lo menos 95%, lo más preferiblemente una identidad de por lo menos 97- 25 99%, con la SEQ ID N° 7 o con la SEQ ID N° 8 en toda la longitud de la SEQ ID N° 7 o de la SEQ ID N° 8. Dichos polipéptidos incluyen aquellos que comprenden los aminoácidos de la SEQ ID N° 7 o de la SEQ ID N° 8.

En una realización preferida, el derivado del antígeno de la prostasa o los fragmentos y homólogos del mismo pueden llevar una mutación en el sitio activo de la proteína para reducir sustancialmente o preferiblemente eliminar su actividad biológica de proteasa. Las mutaciones preferidas implican reemplazar los restos catalíticos histidina y aspartato de la serina proteasa. En una realización preferida, la prostasa contiene una mutación histidina-alanina en el resto 71 de la secuencia de la prostasa [Ferguson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3.114-3.119 (1999)], que corresponde al aminoácido 43 de la secuencia P703PDE5 (SEQ ID N° 8). La proteína mutada tiene preferiblemente una disminución significativa de la eficiencia catalítica (expresada como actividad enzimática específica) de la proteína en comparación con la no mutada. Preferiblemente la reducción de la eficiencia catalítica es por lo menos por un factor de 10^3 , más preferiblemente por lo menos por un factor de 10^6 . La proteína que ha experimentado una mutación de histidina-alanina se representa en lo sucesivo con un asterisco (*).

En una realización, la presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden la prostasa asociada a tumores o fragmentos u homólogos de la misma y una proteína heteróloga o parte de una proteína que actúa como acompañante de fusión. La proteína y el acompañante de fusión pueden estar conjugados químicamente pero preferiblemente están expresadas en forma de proteínas de fusión recombinantes en un sistema de expresión heterólogo.

En una realización preferida de la invención, se

proporciona una proteína de fusión prostasa, o fragmentos u homólogos de la misma, unida a un acompañante inmunológico de fusión que puede ayudar a proporcionar epítomos de linfocitos T cooperadores. Así, el acompañante de fusión puede actuar
5 mediante un efecto cooperador espectador unido a secreción de señales de activación por un gran número de linfocitos T específicos a la proteína o péptido extraño con lo que aumenta la inducción de inmunidad al componente prostasa en comparación con la proteína no fusionada. Preferiblemente, el acompañante
10 heterólogo se selecciona para que sea reconocible por linfocitos T en una mayoría de seres humanos.

En otra realización, la invención proporciona una proteína prostasa, o fragmentos u homólogos de la misma, unida a un acompañante de fusión que actúa como intensificador de la
15 expresión. Así, el acompañante de fusión puede ayudar a auxiliar en la expresión de prostasa en un sistema heterólogo, permitiendo producir niveles incrementados en un sistema de expresión en comparación con la proteína recombinante no modificada.

20 Preferiblemente el acompañante de fusión debe ser un acompañante de fusión inmunológico y un acompañante intensificador de la expresión. En consecuencia, la presente invención en la realización proporciona proteínas de fusión que comprenden la prostasa específica de tumores, o un fragmento de la misma,
25 unida a un acompañante de fusión. Preferiblemente el acompañante de fusión actúa como acompañante de fusión inmunológico y como acompañante intensificador de la expresión. En consecuencia, en una forma preferida de la invención, el acompañante de fusión es

12 T³

la proteína no estructural del virus de la gripe NS1 (hemaglutinina) o un fragmento de la misma. Típicamente se utilizan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque se pueden usar diferentes fragmentos con la condición de que incluyan epítomos de linfocitos T cooperadores [C. Kackett, D. Horowitz, M. Wysocka y S. Dillon, *J. Gen. Virology*, 73, 1.339-1.343 (1992)]. Cuando la proteína NS1 es el acompañante de fusión inmunológico, tiene la ventaja adicional de que permite conseguir una expresión mayor. En particular, dichas fusiones se expresan con rendimientos mayores que las proteínas prostasas recombinantes no modificadas.

En realizaciones preferidas, el resto prostasa en la fusión se selecciona del grupo que comprende la SEQ ID N° 5 (WO 98/12302, de Millenium), SEQ ID N° 6 (WO 98/20117, de Incyte), SEQ ID N° 7 [*PNAS*, 96, 3.114-3.119 (1999)] y SEQ ID N° 8 (WO 00/04149, de Corixa, secuencia P703PDE5). En una realización más preferida, la proteína de fusión comprende los 81 aminoácidos N-terminales de la proteína no estructural NS1 fusionados a los 5 a 226 aminoácidos carboxiterminales de la prostasa mutada especificados en la SEQ ID N° 1 o en la SEQ ID N° 3.

Las proteínas de la presente invención se expresan en una célula huésped apropiada y preferiblemente en *E. coli*. En una realización preferida, las proteínas se expresan con una marca de afinidad como, por ejemplo, una cola de histidina que comprende entre 5 y 9 y preferiblemente seis restos histidina, lo más preferiblemente por lo menos 4 restos histidina. Estos restos son ventajosos para ayudar a la purificación, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos

(IMAC).

La presente invención proporciona también un ácido nucleico que codifica las proteínas de la presente invención. Dichas secuencias pueden ser insertadas en un vector de expresión adecuado y usadas para vacunación por ADN/ARN o expresadas en un huésped adecuado. En realizaciones adicionales, se introducen *in vivo* en células construcciones genéticas que comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención. Esto se puede conseguir usando cualquiera de una diversidad de procedimientos bien conocidos. Uno de los métodos preferidos para aportar *in vivo* una o más secuencias de ácidos nucleicos implica el uso de un vector de expresión, como un microorganismo vírico o bacteriano vivo recombinante. Vectores de expresión víricos adecuados son, por ejemplo, poxvirus (por ejemplo, virus vaccinia, poxvirus de la plaga aviar, poxvirus del canario), alfavirus (virus Sindbis, virus Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana), adenovirus, virus asociados a los adenovirus, picornavirus (virus de la poliomielitis, rinovirus) y herpesvirus (virus varicela-zóster). Otros métodos preferidos para aportar *in vivo* una o más secuencias de nucleótidos implican el uso de un vector de expresión bacteriano, como *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella* y BCG. La inoculación e infección *in vivo* con este vector vivo originará la expresión *in vivo* del antígeno y la inducción de respuestas inmunitarias. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos o estar atenuados de diversas maneras para obtener vacunas vivas. Dichas vacunas vivas forman parte de la invención.

Se puede sintetizar una secuencia de ADN que codifica las

proteínas de la presente invención usando técnicas estándar de síntesis de ADN, como ligación enzimática [descrita por D.M. Roberts et al., *Biochemistry*, 24, 5.090-5.098 (1985)], síntesis química, polimerización enzimática *in vitro* o tecnología de reacción en cadena con polimerasa (PCR) usando, por ejemplo, una polimerasa termoestable, o por una combinación de estas técnicas. La polimerización enzimática de ADN se puede realizar *in vitro* usando una ADN polimerasa, como ADN polimerasa I (fragmento de Klenow) en un tampón apropiado que contiene los nucleósido-trifosfatos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, a una temperatura de 10-37°C, generalmente en un volumen de 50 µl o menos. La ligación enzimática de fragmentos de ADN se puede realizar usando una DAN ligasa, como ADN ligasa T4 en un tampón apropiado, como Tris 0,05M (pH 7,4), MgCl₂ 0,01M, ditiotreitól 0,01M, espermidina 1 mM, ATP 1 mM y seroalbúmina bovina de 0,1 mg/ml, a una temperatura de 4°C a temperatura ambiente, generalmente en un volumen de 50 ml o menos. La síntesis química del polímero o fragmentos de ADN se puede realizar mediante química convencional de fosfotriésteres, fosfitos o fosforamiditos usando técnicas en fase sólida como las descritas en "Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual" (edición de H.G. Gassen y A. Lang), Verlag Chemie Weinheim (1982) o en otras publicaciones científicas, por ejemplo, M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh, B.S. Sproat y R.C. Titmas, *Nucleic Acids Research*, 10, 6.243 (1982); W. Bannwarth, *Tetrahedron Letters*, 24, 5.771 (1983); M.D. Matteucci y M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters*, 21, 719 (1980); M.D.

Matteucci y M.H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society*, 103, 3.185 (1981); S.P. Adams et al., *Journal of the American Chemical Society*, 105, 661 (1983); N.D. Sinha, J. Biernat, J. McMannus y H. Koester, *Nucleic Acids Research*, 12, 4.539 (1984); y H.W.D. Matthes et al., *EMBO Journal*, 3, 801 (1984).

En una realización adicional de la invención, se proporciona un método de producir una proteína como la descrita en la presente Memoria. El procedimiento de la invención se puede realizar mediante técnicas recombinantes convencionales, como las descritas en Maniatis et al., "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, 1982-1989.

En particular, el procedimiento de la invención puede comprender preferiblemente las etapas de:

i) preparar un vector de expresión replicable o integrante capaz de expresar en una célula huésped un polímero de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína o un derivado inmunogénico de la misma,

ii) transformar una célula huésped con el citado vector,

iii) cultivar la citada célula huésped transformada en condiciones que permitan la expresión del citado polímero de ADN para producir la citada proteína y

iv) recuperar la citada proteína.

El término "transformar" se usa en la presente Memoria para significar la introducción de ADN extraño en una célula huésped. Esto se puede conseguir, por ejemplo, por transformación, transfección o infección con un vector vírico o plasmídico apropiado usando, por ejemplo, técnicas convencio-

nales como las descritas en "Genetic Engineering", edición de S.M. Kingsman y A.J. Kingsman, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra, 1988. El término "transformada" o "transformante" se aplicará en lo sucesivo a la célula huésped resultante que contiene y expresa el gen extraño de interés. Los antígenos recombinantes de la invención se expresan preferiblemente en huéspedes multicelulares, más preferiblemente en sistemas bacterianos, lo más preferiblemente en *E. coli*.

Preferiblemente la estrategia recombinante incluye clonar una construcción génica que codifica una proteína de fusión NS1, comprendiendo la construcción génica de 5' a 3' una secuencia de ADN que codifica la proteína NS1 unida a una secuencia de ADN que codifica la proteína de interés, en un vector de expresión para formar un fragmento de ADN que codifica una proteína de fusión NS1-P703P carboxiloterminale. Se puede diseñar una cola de afinidad de polihistidina en el extremo carboxilo terminal de la proteína de fusión que permite la purificación simplificada mediante cromatografía de afinidad.

Los vectores de expresión son nuevos y también forman parte de la invención.

Los vectores de expresión replicables se pueden preparar de acuerdo con la invención escindiendo un vector compatible con la célula huésped para proporcionar un segmento lineal de ADN que tiene un replicón intacto y combinando el citado segmento lineal con una o más moléculas de ADN que, junto con el citado segmento lineal, codifican el producto deseado, como el polímero de ADN que codifica la proteína de la invención o un derivado de la misma en condición ligantes.

Así, se puede preformar o formar el ADN híbrido durante la construcción del vector, según se desee.

La elección del vector vendrá determinada en parte por la célula huésped, que puede ser procariótica o eucariótica, aunque
5 preferiblemente son células de *E. coli*, levadura o CHO. Vectores adecuados incluyen plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y virus recombinantes. Los vectores clonantes y de expresión contienen preferiblemente un marcador tal que sólo las células huéspedes que expresan el marcador sobrevivirán en condiciones selectivas.
10 Los genes de selección incluyen pero no están limitados al gen que codifica la proteína que confiere resistencia a la ampicilina, tetraciclina o kanamicina. Los vectores de expresión contienen también secuencias de control que son compatibles con el huésped designado. Por ejemplo, las secuencias de control de
15 expresión de *E. coli*, y más generalmente de procariotas, incluyen promotores y sitios de unión a ribosomas. Las secuencias de promotores pueden ser naturales, como la β -lactamasa (penicilinas) [Weisman, *Interferon 3* (edición de L. Gresser), 1981], lactosa (*lac*) [Chang et al., *Nature*, 198, 1.056
20 (1977)] y triptófano (*trp*) [Goeddel et al., *Nucl. Acids Res.*, 8, 4.057 (1980)] y sistema promotor P_L λ derivado. Además, promotores sintéticos no naturales funcionan también como promotores bacterianos. Este es el caso, por ejemplo, del promotor híbrido sintético *tac* que se deriva de secuencias de
25 los promotores *trp* y *lac* [De Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 21-26 (1983)]. Estos sistemas son particularmente adecuados con *E. coli*.

Los vectores compatibles de levaduras pueden llevar también marcadores que permiten la selección de transformantes exitosos por conferir prototrofia a mutantes auxotróficos o resistencia a metales pesados en cepas de tipo salvaje. Las

5 secuencias de control para vectores de levaduras incluyen promotores de enzimas glucolíticas [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7, 149 (1968)], gen PHO5 que codifica fosfatasa ácida, gen CUP1, gen ARG3, promotores de genes GAL y secuencias de promotores sintéticos. Otros elementos de control útiles en

10 expresión de levaduras son terminadores y secuencias conductoras. La secuencia conductora es particularmente útil puesto que típicamente codifica un péptido señal compuesto de aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. Las secuencias señales adecuadas pueden ser

15 codificadas por genes para proteínas segregadas de levaduras, como el gen invertasa de la levadura y el gen factor a, fosfatasa ácida, toxina destructora, el gen α de apareamiento y recientemente la secuencia señal de inulinasa heteróloga derivada del gen INU1A de *Kluyveromyces marxianus*. Se han

20 desarrollado vectores adecuados para expresión en *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Hay disponible una diversidad de vectores de expresión de *P. pastoris* basados en diversos promotores inducibles o constitutivos [Cereghino y Cregg, *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 45-

25 66 (2000)]. Para la producción de proteínas citosólicas y segregadas, los vectores de *P. pastoris* más comunes contienen el promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) fuertemente regulado. Los

vectores contienen también el gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4) de *P. pastoris* para selección en huéspedes his4. La secreción de proteína extraña requiere la presencia de una secuencia señal y se ha usado mucho y con éxito la secuencia conductora del factor α de apareamiento de *S. cerevisiae* en sistemas de expresión de *Pichia*. Los vectores de expresión se integran en el genoma de *P. pastoris* para maximizar la estabilidad de cepas de expresión. Como en *S. cerevisiae*, la escisión de un vector de expresión de *P. pastoris* en una secuencia compartida por el genoma del huésped (AOX1 o HIS4) estimula sucesos de recombinación homóloga que dirigen eficientemente la integración del vector al locus genómico. En general, una cepa recombinante que contiene varias copias integradas de una casete de expresión puede dar más proteína heteróloga que una cepa de una sola copia. La forma más eficaz de obtener transformantes con un número elevado de copias requiere la transformación de cepa receptora *Pichia* mediante técnicas de esferoplastos [Cregg et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5, 3.376-3.385 (1985)].

La preparación del vector replicable de expresión se puede realizar convencionalmente con enzimas apropiadas para la restricción, polimerización y ligación del ADN mediante procedimientos descritos, por ejemplo, en Maniatis et al., referencia citada anteriormente.

La célula huésped recombinante se prepara, de acuerdo con la invención, transformando una célula huésped con un vector replicable de expresión de la invención en condiciones

transformantes. Las condiciones transformantes adecuadas son convencionales y se describen, por ejemplo, en Maniatis et al., referencia citada anteriormente, o en "DNA Cloning", vol. II, edición de D.M. Glover, IRL Press Ltd., 1985.

5 La elección de las condiciones transformantes depende de la elección de la célula huésped que ha de ser transformada. Por ejemplo, anteriormente se ha descrito transformación *in vivo* usando un vector vírico vivo como agente transformante para los polinucleótidos de la invención. La transformación bacteriana de
10 un huésped como *E. coli* se puede hacer por absorción directa de los polinucleótidos (que pueden ser vectores de expresión que contienen la secuencia deseada) después de haber tratado el huésped con una solución de CaCl_2 [Cohen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 2.110 (1973)] o con una solución que comprende
15 una mezcla de cloruro de rubidio (RbCl), MnCl_2 , acetato potásico y glicerol y después con ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico, RbCl y glicerol. La transformación de organismos eucarióticos inferiores como células de levaduras en cultivo por absorción
directa se puede realizar usando el método de Hinnen et al.
20 [*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 1.929-1.933 (1978)]. Se pueden transformar células de mamíferos en cultivo usando la coprecipitación con fosfato cálcico del vector de ADN en las células [Graham y Van der Eb, *Virology*, 52, 546 (1978)]. Otros métodos para introducir polinucleótidos en células de mamíferos
25 incluyen transfección mediada por dextrano, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del(de los) polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa de los polinucleótidos en núcleos. La

invención se extiende también a una célula huésped transformada con un ácido nucleico que codifica la proteína de la invención o un vector replicable de expresión de la invención.

El cultivo de la célula huésped transformada en condiciones que permitan la expresión del polímero de ADN se realiza convencionalmente como se describe, por ejemplo, en Maniatis et al., referencia citada anteriormente, y en "DNA Cloning". Así, preferiblemente se suministra nutriente a la célula y se cultiva a una temperatura por debajo de 50°C, preferiblemente entre 25 y 35°C, lo más preferiblemente a 30°C. El tiempo de incubación puede variar desde unos pocos minutos hasta unas pocas horas, de acuerdo con la proporción del polipéptido en la célula bacteriana, analizada por transferencia western o por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

El producto puede ser recuperado por métodos convencionales de acuerdo con la célula huésped y de acuerdo con la localización del producto de expresión (intracelular o segregado en el medio de cultivo o en el periplasma de la célula). Así por ejemplo, cuando la célula huésped es bacteriana, como *E. coli*, puede ser lisada física, química o enzimáticamente y la proteína producto puede ser aislada del lisado resultante. Cuando la célula huésped es de un mamífero, generalmente el producto puede ser aislado del medio nutriente o de extractos exentos de células. Cuando la célula huésped es una levadura, como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, generalmente el producto puede ser aislado de células lisadas o del medio de

cultivo y purificado después usando técnicas convencionales. La especificidad del sistema de expresión puede ser analizada por transferencia western usando un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de interés.

5 Técnicas convencionales de aislamiento de proteínas incluyen precipitación selectiva, cromatografía de adsorción y cromatografía de afinidad, incluida una columna de afinidad de anticuerpos monoclonales. Cuando las proteínas de la presente invención se expresan con una cola de histidina (marca de His),
10 pueden ser purificadas fácilmente por cromatografía de afinidad usando una columna de cromatografía de afinidad de iones metálicos (IMAC).

En una realización preferida de la invención, se proporcionan las proteínas de la presente invención con una
15 marca de afinidad, como una cola de polihistidina. En tales casos, la proteína después de la etapa de bloqueo se somete preferiblemente a cromatografía de afinidad. En estas proteínas con una cola de polihistidina, se puede realizar cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC). El ion
20 metálico puede ser cualquier ion adecuado, por ejemplo, zinc, níquel, hierro, magnesio o cobre, aunque preferiblemente es zinc o níquel. Preferiblemente el tampón de la columna IMAC contiene detergente, preferiblemente un detergente no iónico, como Tween 80, o un detergente híbrido, como Empigen BB, porque esto puede
25 originar niveles menores de endotoxina en el producto final.

Etapas cromatográficas adicionales incluyen, por ejemplo, una etapa con Sepharose Q que puede ser realizada antes o después de la columna IMAC. El pH está preferiblemente en el

intervalo de 7,5 a 10, más preferiblemente de 7,5 a 9,5, óptimamente entre 8 y 9, idealmente 8,5.

Las proteínas de la presente invención se proporcionan en forma soluble en un líquido o en forma liofilizada, que es la forma preferida. Se supone generalmente que cada dosis humana comprende 1 a 1.000 μg , preferiblemente 30 a 300 μg de proteína.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una proteína de la presente invención en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición de vacuna preferida comprende por lo menos NS1-P703P* (SEQ ID N° 1) o NS1-P703P (SEQ ID N° 3). Preferiblemente la citada proteína tiene grupos tiol bloqueados y es muy pura; tiene, por ejemplo, menos de 5% de contaminación de células huéspedes. Dicha vacuna puede contener opcionalmente uno o más de otros antígenos y derivados asociados con tumores. Por ejemplo, otro antígeno asociado adecuado incluye PAP-1, PSA (antígeno específico prostático), PSMA (antígeno de membrana específico prostático), PSCA (antígeno de células prostáticas pluripotenciales), STEAP.

La preparación de la vacuna se describe generalmente en "Vaccine Design - The subunit and adjuvant approach", edición de M.F. Powell y M.J. Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995. La encapsulación con liposomas se describe en la patente de los Estados Unidos 4.235.877, de Fullerton.

Preferiblemente, en la formulación de la invención se añaden adyuvantes a las proteínas de la presente invención. Hay disponibles comercialmente adyuvantes adecuados como, por ejemplo, adyuvante completo y adyuvante incompleto de Freund
 5 (Difco Laboratories, Detroit, MI), adyuvante Merck 65 (Merck and Company Inc., Rahway, NJ), AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA), sales de aluminio como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, sales de calcio, hierro o zinc, una suspensión insoluble de tirosina acilada,
 10 azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente, polifosfacenos, microesferas biodegradables y monofosforil-lípido A y quil A. Como adyuvantes también se pueden usar citoquinas, como GM-CSF

GM-CSF o interleucina 2, 7 ó 12.

15 En las formulaciones de la invención se prefiere que la composición del adyuvante induzca una respuesta inmunitaria, predominantemente del tipo TH1. Niveles altos de citoquinas del tipo Th1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por
 20 células a un antígeno administrado. En una realización preferida, en la que una respuesta es predominantemente del tipo Th-1, el nivel de citoquinas del tipo Th1 se incrementará en mayor extensión que el nivel de citoquinas del tipo Th2. Los niveles de estas citoquinas pueden ser analizados usando ensayos
 25 estándar. Para un estudio de las familias de citoquinas, véase Mosmann y Coffman, *Ann. Rev. Immunol.*, 7, 145-173 (1989).

En consecuencia, adyuvantes adecuados para provocar una

respuesta predominantemente del tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil-lípido A, preferiblemente monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) junto con una sal de aluminio. Otros adyuvantes conocidos que inducen

5 preferencialmente una respuesta inmunitaria del tipo TH1 incluyen oligonucleótidos que contienen CpG. Los oligonucleótidos se caracterizan porque el dinucleótido CpG no está metilado. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en la patente WO 96/02555. También se

10 describen secuencias de ADN inmunoestimulador, por ejemplo, en Sato et al., *Science*, 273, 352 (1996). Otro adyuvante preferido es una saponina, preferiblemente QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), que se puede usar sola o combinada con otros adyuvantes. Por ejemplo, un sistema mejorado implica la

15 combinación de un monofosforil-lípido A y un derivado de una saponina, como la combinación de QS21 y 3D-MPL descrita en la patente WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que la QS21 está atenuada con colesterol, descrita en la patente WO 96/33739. Otras formulaciones preferidas comprenden una

20 emulsión aceite en agua y tocoferol. Una formulación de un adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión aceite en agua se describe en la patente WO 95/17210.

Una formulación de un adyuvante particularmente potente

25 que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión aceite en agua se describe en la patente WO 95/17210 y es una formulación preferida.

Otros adyuvantes preferidos incluyen Montanide ISA 720

(Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), Detox (Ribi, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) y otros glucosaminido-4-fosfatos de aminoalquilo (AGP).

5 Otros adyuvantes preferidos incluyen moléculas de adyuvantes de la fórmula general (I):



en la que n es 1-50, A es un enlace o -C(O)-, R es alquilo C₁-C₅₀ o fenil(alquilo C₁-C₅₀).

10 Una realización de la presente invención consiste en una formulación de una vacuna que comprende un éter de polioxietileno de fórmula general (I), en la que n es entre 1 y 50, preferiblemente entre 4 y 24, lo más preferiblemente 9, el componente R es alquilo C₁-C₅₀, preferiblemente alquilo C₁-C₄, lo
15 más preferiblemente alquilo C₁₂ y A es un enlace. La concentración de los éteres de polioxietileno debe estar en el intervalo de 0,1 a 20%, preferiblemente de 0,1 a 10% y lo más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 1%. Los éteres de polioxietileno se seleccionan del grupo siguiente:
20 polioxietilén-9-lauril éter, polioxietilén-4-lauril éter, polioxietilén-35-lauril éter y polioxietilén-23-lauril éter. Se describen éteres de polioxietileno, como polioxietilén lauril éter, en el índice Merck (12^a edición, entrada 7717). Estas moléculas de adyuvantes se describen en la patente WO 99/52549.

Si se desea, el éter de polioxietileno de acuerdo con la fórmula (I) anterior se puede combinar con otro adyuvante. Por ejemplo, una combinación preferida de adyuvantes es preferiblemente una con CpG, descrita en la solicitud de patente del Reino Unido, pendiente de tramitación, GB 9820956.2.

En consecuencia, en una realización de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende una proteína de la presente invención, más preferiblemente una proteína NS1-P703P* y, como adyuvante, monofosforil-lípido A o un derivado del mismo, QS21 y tocoferol en una emulsión aceite en agua.

Preferiblemente la vacuna comprende adicionalmente una saponina, más preferiblemente QS21. Otra formulación de adyuvante particular adecuado que incluye CpG y una saponina se describe en la patente WO 00/09159 y es una formulación preferida. Lo más preferiblemente, la saponina en esta formulación particular es QS21. Preferiblemente, la formulación comprende adicionalmente una emulsión aceite en agua y tocoferol.

En las composiciones farmacéuticas y vacunas se puede emplear cualquiera de una diversidad de vehículos portadores para facilitar la producción de una respuesta inmunitaria específica a un antígeno que se dirige a células tumorales. Los vehículos portadores incluyen células presentadoras de antígeno (APC), como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, monocitos y otras células que pueden ser diseñadas para ser APC eficientes. Se pueden modificar genéticamente dichas células, aunque no es necesario, para incrementar la capacidad de presentar el antígeno, mejorar la activación y/o conservación de

la respuesta de linfocitos T, tener *per se* efectos antitumorales y/o ser inmunológicamente compatibles con el receptor (esto es, el haplotipo HLA apareado). Generalmente las células APC se pueden aislar de cualquiera de una diversidad de fluidos y
5 órganos biológicos, incluidos tejidos tumorales y peritumorales, y pueden ser células autólogas, alogénicas, singénicas o xenogénicas.

Ciertas realizaciones preferidas de la presente invención usan, como células presentadoras de antígeno, células
10 dendríticas o progenitoras de las mismas. Las células dendríticas son APC muy potentes [Banchereau y Steinman, *Nature*, 392, 245-251 (1998)] y han demostrado ser eficaces como adyuvante fisiológico para provocar inmunidad antitumoral profiláctica o terapéutica [véase Timmerman y Levy, *Ann. Rev. Med.*,
15 50, 507-529 (1999)]. En general, las células dendríticas pueden ser identificadas en base a su forma típica [estelar *in situ*, con procesos citoplasmáticos notables (dendritas) visibles *in vitro*], a su capacidad de absorber, procesar y presentar antígenos con gran eficacia y a su capacidad de activar
20 respuestas de linfocitos T no maduros. Por supuesto, las células dendríticas pueden ser diseñadas para expresar receptores o ligandos específicos de la superficie de las células que no se encuentran comúnmente en células dendríticas *in vivo* o *ex vivo* y dichas células dendríticas modificadas están contempladas por la
25 presente invención. Como alternativa a las células dendríticas, en una vacuna se pueden usar células dendríticas cargadas de antígeno de vesículas segregadas (denominadas exosomas) [véase Zitvogel et al., *Nature*, 4, 594-600 (1998)].

Se pueden obtener células dendríticas y sus progenitoras a partir de sangre periférica, médula ósea, células infiltrantes en tumores, células infiltrantes en tejidos peritumorales, ganglios linfáticos, bazo, piel, sangre del cordón umbilical o cualquier otro tejido o fluido adecuado. Por ejemplo, se pueden diferenciar ex vivo células dendríticas añadiendo una combinación de citoquinas, como GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o TNF α , a cultivos de monocitos extraídos de sangre periférica. Alternativamente, se pueden diferenciar, en células dendríticas, células positivas CD34 extraídas de sangre periférica, sangre del cordón umbilical o médula ósea añadiendo al medio de cultivo combinaciones de GM-CSF, IL-3, TNF α , ligando CD40, lipopolisacárido LPS, ligando flt3 y/u otro(s) compuesto(s) que induzcan diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas.

Las células dendríticas se clasifican convenientemente en células "inmaduras" y "maduras", lo cual permite una forma sencilla de discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debe excluir todas las fases intermedias posibles de diferenciación. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como células APC con una gran capacidad de absorber y procesar antígenos, que se relaciona con la gran expresión de receptor de Fc γ y receptor de manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una expresión menor de estos marcadores pero por una gran expresión de moléculas de la superficie de las células responsables de la activación de linfocitos T, como MHC de clase I y de clase II,

moléculas de adherencia (por ejemplo, CD54 y CD11) y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1BB).

Las células APC pueden ser transfectadas generalmente con un polinucleótido que codifica la proteína tumoral prostasa (o un derivado de la misma) de modo que el polipéptido tumoral prostasa, o una porción inmunogénica del mismo, se exprese en la superficie de las células. Dicha transfección puede tener lugar ex vivo y después se puede usar una composición o vacuna que comprenda dichas células transfectadas con fines terapéuticos como se describe en la presente Memoria. Alternativamente, se puede administrar a un paciente un vehículo portador de un gen que se dirige a una célula dendrítica o a otra célula presentadora de antígeno originando transfección *in vivo*. Generalmente la transfección *in vivo* y *ex vivo* de células dendríticas se puede realizar, por ejemplo, usando cualesquiera métodos conocidos en la técnica, como los descritos en la patente WO 97/24447 o el procedimiento de inyección de genes descrito por Mahvi et al., *Immunology and cell Biology*, 75, 456-460 (1997). Se puede conseguir cargar células dendríticas con antígeno incubando células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido tumoral prostasa, ADN (desnudo o en un vector plasmídico) o ARN, o con bacterias o virus recombinantes que expresen el antígeno (por ejemplo, vectores de virus vaccinia, virus de la plaga aviar, adenovirus o lentivirus).

Las vacunas y composiciones farmacéuticas se pueden presentar en envases con una dosis unidad o con varias dosis, como ampollas o viales sellados. Preferiblemente, dichos envases

se sellan herméticamente para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones se pueden guardar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. Alternativamente, se puede
5 guardar una vacuna o composición farmacéutica en estado liofilizado, que requiere sólo la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de usarla.

La presente invención proporciona también un método para producir una formulación de una vacuna, que comprende mezclar
10 una proteína de la presente invención con un excipiente farmacéuticamente aceptable, como 3D-MPL.

Otro aspecto de la invención es el uso de una proteína o de un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones de la presente invención, para la fabricación de una vacuna para
15 tratar inmunoterapéuticamente un paciente que padece cáncer de próstata u otros tumores asociados con una prostasa.

FIGURAS

Figura 1: Diseño de la proteína de fusión NS1-P703^{*}-His expresada en *E. coli*.

20 Figura 2: Estructura primaria de la proteína de fusión NS1-P703^{*}-His expresada en *E. coli* (SEQ ID N° 1).

Figura 3: Secuencia codificadora de NS1₁₋₈₁-P703P^{*} (SEQ ID N° 2).

Figura 4: Estrategia de clonación para producir NS1-P703P^{*}-
25 His en *E. coli*.

Figura 5: Mapa de plásmidos de RIT 14952.

Figura 6: Procedimiento de fermentación de NS1-P703P^{*} de *E. coli*.

Figura 7: Procedimiento de purificación de NS1-P703P* de *E. coli*.

Figura 8: Inmunogenicidad de NS1-P703P* con adyuvante SBAS2.

5 Figura 9: Estructura primaria de la proteína de fusión NS1-P703-His expresada en *E. coli* (SEQ ID N° 3).

Figura 10: Secuencia codificadora de NS1₁₋₈₁-P703P-His (SEQ ID N° 4).

10 A continuación se describirá adicionalmente la invención con referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLO I

Preparación de la cepa de *E. coli* recombinante que expresa la proteína de fusión NS1-P703P*-3-His

1. Diseño de la proteína

15 La estrategia de expresión seguida para este candidato incluyó el diseño de la estructura primaria más apropiada para la proteína recombinante que tuviera las mejores expectativas tanto de buen nivel de expresión como de proceso de fácil purificación.

20 Aunque la probabilidad de que una proteína recombinante pueda conservar su actividad biológica de prostasa cuando se formule para una vacuna es realmente muy baja, se hizo la mutación del sitio activo para reducir sustancialmente o preferiblemente eliminar su actividad biológica proteolítica. En
25 consecuencia, el resto His en la posición 43 de la SEQ ID N° 8 se cambió a un resto Ala.

El diseño de la proteína de fusión NS1-P703*-His que ha de ser expresada en *E. coli* se describe en la figura 1. Esta fusión

contiene los 81 aminoácidos N-terminales de la proteína no estructural del virus de la gripe, seguidos de la secuencia de aminoácidos no procesados de antígeno prostasa (aminoácidos 5 → 226 de la secuencia p703pde5 descrita en la SEQ ID N° 8 que contiene la mutación His → Ala del resto 43 del sitio activo de la proteasa) seguidos por la cola His. Se añadió la cola His a la prostasa para permitir la purificación versátil de la proteína de fusión procesada. La longitud de la fusión es de 313 aminoácidos.

La estructura primaria de la proteína resultante tiene la secuencia descrita en la figura 2. La secuencia codificadora correspondiente a la proteína anterior se ilustra en la figura 3 y fue colocada posteriormente bajo el control del promotor λ pL en un plásmido de expresión de *E. coli*.

2. El sistema de expresión de *E. coli*

Para la producción de la proteína NS1, el ADN que codifica los 81 restos aminotermiales de la proteína NS1 (proteína no estructural del virus de la gripe) se clonó en el vector de expresión pMG 81. Este plásmido utiliza señales del ADN del fago lambda para dirigir la transcripción y traducción de genes extraños insertados. El vector contiene el promotor PL lambda PL, operador OL y dos sitios de utilización (NutL y NutR) para mitigar efectos transcripcionales de polaridad cuando se proporciona la proteína N [Gross et al., *Mol. & Cell. Biol.*, 5, 1.015 (1985)]. Los vectores que contienen el promotor PL se introducen en un huésped lisogénico *E. coli* para estabilizar el ADN del plásmido. Las cepas del huésped lisogénico contienen ADN

del fago lambda defectuoso de replicación integrado en el genoma [Shatzman et al., "Experimental Manipulation of Gene Expression", edición de Inouya, pág. 1-14, Academic Press, N.Y. (1983)]. El ADN del fago lambda dirige la síntesis de la proteína represora cI que se une al represor OL del vector y evita la unión de la ARN polimerasa al promotor PL y, por lo tanto, la transcripción del gen insertado. El gen cI de la cepa de expresión AR58 contiene una mutación sensible a la temperatura por lo que la transcripción dirigida por el promotor PL puede ser regulada cambiando la temperatura, esto es, un incremento de la temperatura del cultivo inactiva al represor y se inicia la síntesis de la proteína extraña. Este sistema de expresión permite la síntesis controlada de proteínas extrañas, especialmente las que pueden ser tóxicas a la célula [Shimataka y Rosenberg, *Nature*, 292, 128 (1981)].

3. La cepa AR58 de *E. coli*

La cepa lisogénica AR58 de *E. coli* usada para la producción de la proteína NS1-P703P^{*}-His es una derivada de la cepa estándar N99 K12 de *E. coli* NIH (F⁻ su⁻ galK2, lacZ⁻ thr⁻). Contiene un fago lambda lisogénico defectuoso (galE::TN10, I Kil⁻ cI857 DH1). El fenotipo Kil⁻ evita la interrupción de la síntesis macromolecular del huésped. La mutación cI857 confiere al represor cI una lesión sensible a la temperatura. La delección DH1 separa el operón de la derecha del fago lambda y los loci bio, uvr3 y chlA del huésped. La cepa AR58 se generó por transducción de N99 con una carga de fago lambda P cultivado previamente en un derivado SA500 (galE::TN10, I Kil⁻ cI857 DH1). La introducción del lisógeno defectuoso en

N99 se seleccionó con tetraciclina debido a la presencia de un transposón TN10 que codifica resistencia a la tetraciclina en el gen galE adyacente. N99 y SA500 son cepas K12 de *E. coli* obtenidas del laboratorio del Dr. Martin Rosenberg en el National Institute of Health.

4. Construcción del vector diseñado para expresar la proteína recombinante NS1-P703P^{*}-His

Los materiales de partida fueron:

1) un plásmido de cADN recibido de CORIXA p703pde5 (patente WO 00/04149), en el que faltan la secuencia señal putativa y un trozo del propéptido de P703P (véase la figura 1) y que contiene la secuencia codificadora del antígeno prostasa,

2) vector pRIT14901 que contiene la versión larga del promotor PL y

3) plásmido PMG81 que contiene los 81 aminoácidos de la región codificadora NS₁ del virus de la gripe.

La estrategia de clonación resumida en la figura 4 incluyó las siguientes etapas:

a) amplificación PCR de la secuencia p703 con sitios de restricción NcoI y SpeI. El molde para la reacción PCR fue el plásmido del cADN recibido de CORIXA, la dirección del oligonucleótido can139 : 5'GCG CCC ATG GTT GGG GAG GAC TGC AGC CCG 3', y la antidi dirección del oligonucleótido can134 : 5'GGG ACT AGT ACT GGC CTG GAC GGT TTT CTC 3',

b) inserción de las secuencias amplificadas en el vector comercial Litmus 28 (Biolabs), que origina el plásmido intermedio pRIT 14949,

c) mutagénesis dirigida His → Ala del resto 43 de la secuencia p703 contenida en el plásmido pRIT 14949 usando el oligonucleótido de dirección can140 : 5'CTG TCA GCC GCA GCG TGT TTC CAG 3' y el oligonucleótido de antidi-rección can141 : 5'CTG
5 GAA ACA CGC TGC GGC TGA CAG 3', que origina la obtención del plásmido pRIT 14950,

d) aislamiento del fragmento NcoI-SpeI del plásmido pRIT 14950,

e) a partir del plásmido pMG81, purificación del fragmento
10 NS1 (81 aminoácidos) después de digestión de los sitios de restricción BamHI-NcoI,

f) ligación de los dos fragmentos al plásmido de expresión pRIT 14901 (longitud igual a la de pr PL),

g) selección y caracterización de los transformantes de la
15 cepa AR58 de *E. coli* que contienen el plásmido pRIT 14952 (véase la figura 5) que expresan la proteína de fusión NS1-p703 mutada-His.

La cepa recombinante produce así la proteína de fusión NS1-P703P*-cola de His, de 313 restos aminoácidos de longitud
20 (véase la figura 2), con la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID N° 1 y la secuencia codificadora descrita en la SEQ ID N° 2.

EJEMPLO II

25 Preparación de la proteína de fusión Nsl-P703P*-3-His recombinante

1. Desarrollo e inducción de la cepa bacteriana B1225 - Ex-

37 

presión de NS1-P703P⁺-3-His

Se desarrollaron células de AR58 transformadas con plásmido pRIT 14952 (cepa B1225) en un matraz de 2 litros que contenía 400 ml de medio FECO15AA suplementado con sulfato de kanamicina (100 mg/l). Después de incubar durante 16 horas a 30°C y a 200 rpm, se sacó del matraz una muestra pequeña para su examen microscópico.

Se transfirieron 50 ml de este precultivo a un fermentador de 20 litros que contenía 8,7 litros de medio

FECO12AF suplementado con sulfato de kanamicina (50 mg/l). El pH se ajustó y mantuvo a 6,8 por adición de NH₄OH (25% v/v) y la temperatura se mantuvo a 30°C. La velocidad de aireación se mantuvo constante a 20 l/min y la presión de O₂ se reguló al 20% de la de saturación por retrocontrol de la velocidad de agitación. La presión de descarga se mantuvo a 0,5 bares.

El proceso de fermentación se basó en glicerol como fuente de carbono. Se añadió la solución de alimentación a una velocidad inicial de 0,04 ml/min y se incrementó exponencialmente durante las primeras 30 horas para limitar el desarrollo para poder mantener un nivel mínimo de la presión de O₂ del 20%.

Después de 30 horas, se incrementó rápidamente la temperatura del fermentador a 39,5°C para inducir la expresión intracelular del antígeno NS1-P703P⁺-His. La velocidad de alimentación se mantuvo constante a 1,28 ml/min durante toda la fase de inducción (18 horas).

Durante las fases de desarrollo e inducción se tomaron

muestras del caldo para seguir el desarrollo bacteriano y la expresión del antígeno. También se realizaron en estos materiales ensayos microbiológicos de identificación y pureza.

Al término de la fermentación, la biomasa alcanzó una densidad óptica de aproximadamente 130, que corresponde a una densidad de células secas de aproximadamente 50 g/l. El volumen final fue aproximadamente 10,5 litros. Las células que contenían el antígeno se separaron directamente del medio de cultivo por centrifugación a 5.000g durante 1 hora a 4°C y el granulado se guardó a -70°C en bolsas de plástico.

2. Extracción de la proteína

La proteína NS1-P703P⁺-His recombinante, expresada en *E. coli* como cuerpos de inclusión, se purificó a partir del homogeneizado usando diferentes etapas (véase la figura 6).

En resumen, se descongelaron a +4°C células concentradas congeladas recogidas de la fermentación, antes de resuspenderlas en tampón de rotura (fosfato 20 mM, NaCl 2M, EDTA 5 mM; pH 7,5) a una densidad óptica (OD₆₅₀) de 120. Dos pasadas a través de un homogeneizador de alta presión (1.000 bares) rompió las células.

EJEMPLO III

Purificación de la proteína de fusión NS1-P703P⁺-His

a) Introducción

Como se ha indicado anteriormente, la proteína recombinante NS1-P703P⁺-His se produce en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión. Una cuestión importante en el sistema del método

de purificación fue la oxidación de la proteína recombinante consigo misma o con contaminantes de la célula huésped, probablemente por unión covalente con enlaces disulfuro. El proceso desarrollado pretendía reducir el fenómeno de oxidación masiva para tener un producto muy purificado junto con un rendimiento global aceptable, conservando al mismo tiempo la capacidad del producto de producir una respuesta inmunitaria eficaz contra el antígeno de interés.

a) Descripción del proceso

La suspensión de células rotas se trató en un sistema Pallsep VMF (filtración a través de membrana vibrante) (Pall-Filtron) equipado con membrana de 0,45 μm . La "fracción granular" se lavó primero por diafiltración con tampón fosfato 20 mM (pH 7,5) que contenía 0,5% de detergente Empigen BB. El material lavado se solubilizó después en el mismo tampón que contenía hidrocloreuro de guanidina 4M y glutatión 20 mM. El producto se recuperó a través de un filtro de 0,45 μm y el permeado se trató con yodoacetamida 200 mM para evitar el reacomplamiento por oxidación.

La fracción carboxiamidada se sometió a cromatografía IMAC (Sephacrose FF quelante de níquel; Pharmacia). La columna se equilibró primero con tampón Tris 20 mM (pH 7,5) que contenía urea 4M, 0,5% de Tween 80 e imidazol 20 mM. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con el mismo tampón. La proteína se eluyó después en el tampón anterior con imidazol 400 mM.

Antes de continuar la cromatografía de intercambio aniónico, se redujo la conductancia del eluido IMAC por debajo de 5

40 ~~24~~

mS/cm con tampón Tris 20 mM (pH 8,5) que contenía urea 4M y 0,5-1,0% de Tween 80. El soporte del lecho relleno (Sephacrose Q FF; Pharmacia) se equilibró con el tampón de dilución. Después de cargar la muestra y de una etapa de lavado con el tampón de
5 equilibración, la proteína se eluyó con el mismo tampón que contenía NaCl 250 mM.

El eluido de Sepharose Q FF se diafiltró después contra el tampón apropiado de almacenamiento (tampón Tris 20 mM; pH 8,0) en una unidad de filtración de flujo tangencial equipada con una
10 membrana de corte de 10 Kd (Omega, Filton).

El retenido de la ultrafiltración que contenía la proteína NS1-P703P^{*}-His se sometió a filtración estéril a través de una membrana de 0,22 μ m.

El rendimiento global de la purificación fue muy alto:
15 aproximadamente 3-4 gramos de material purificado/litro de homogeneizado (OD 120).

EJEMPLO IV

Preparación de una vacuna usando la proteína NS1-P703P^{*}-His

20 1. Preparación de una vacuna usando la proteína NS1-P703P^{*}-His

La vacuna usada en estos experimentos se produce a partir de ADN recombinante que codifica la proteína NS1-P703P^{*}-His expresada en *E. coli* de la cepa AR58, con o sin adyuvante. Como adyuvante, la formulación comprende una mezcla de monofosforil-
25 lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) y QS21 en una emulsión aceite/agua. El sistema adyuvante SBAS2 ha sido descrito anteriormente (patente WO 95/17210).

3D-MPL: es un inmunoestimulador derivado del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria Gram negativa *Salmonella minnesota*. El monofosforil-lípido (MPL) ha sido desacilado y carece de un grupo fosfato en el resto de lípido A. Este tratamiento químico reduce drásticamente la toxicidad, conservando las propiedades inmunoestimuladoras (Ribi, 1986). Ribi Immunochemistry produce y suministra MPL a SB-Biologicals. Experimentos realizados en SmithKline Beecham Biologicals han demostrado que 3D-MPL combinado con diversos vehículos intensifica enormemente tanto la inmunidad humoral como un tipo de TH1 de inmunidad celular.

QS1: es una molécula de saponina natural extraída de la corteza de *Quillaja saponaria Molina*, un árbol de Sudamérica. Una técnica de purificación desarrollada para separar de los extractos brutos de la corteza las saponinas individuales permitió el aislamiento de la saponina particular, QS21, que es un triterpenoglucósido que demuestra una actividad adyuvante mayor y una toxicidad menor en comparación con el componente generador. La saponina QS21 ha demostrado activar CTL restringidos de clase I a varios antígenos subunitarios así como estimular la proliferación linfocítica específica de antígenos (Kensil, 1992). Aquila (antiguamente Cambridge Biotech Corporation) produce y suministra QS21 a SB-Biologicals.

Experimentos realizados en SmithKline Beecham Biologicals han demostrado un efecto sinérgico evidente de las combinaciones de MPL y QS21 en la inducción de respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares del tipo TH1.

La emulsión aceite/agua comprende una fase orgánica

compuesta de dos aceites (un tocoferol y escualeno) y una fase acuosa de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene Tween 80 como emulsionante. La emulsión comprendía 5% de escualeno, 5% de tocoferol y 0,4% de Tween 80 y tenía un tamaño medio de partículas de 180 nm y se conoce como SB62 (véase la patente WO 95/17210).

Experimentos realizados en SmithKline Beecham Biologicals han demostrado que la adición, como adyuvante, de esta emulsión aceite/agua a 3D-MPL/QS21 (SBAS2) incrementa más las propiedades inmunoestimuladoras de este último frente a diversos antígenos subunitarios.

2. Preparación de la emulsión SB62 (concentrada al doble)

Se disolvió Tween 80 en PBS, dando una solución del 2% en PBS. Para proporcionar 100 ml de emulsión concentrada al doble, se agitaron vorticialmente 5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno para mezclarlos perfectamente. Se añadieron y mezclaron perfectamente 90 ml de solución PBS/Tween. La emulsión resultante se pasó después a través de una jeringa y finalmente se microfluidizó usando una máquina de microfluidización M110S. Las gotitas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

3. Liofilización de NS1-P703P*-His

En la práctica, se disuelven todos los componentes y se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,2 μ m. Las formulaciones se prepararon el día de la liofilización.

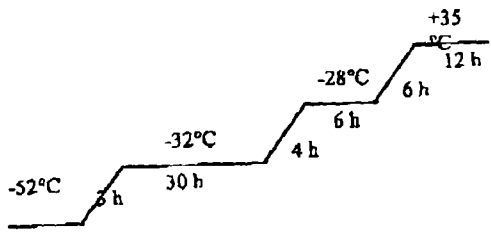
La secuencia de la formulación fue:

43

H₂O + sacarosa del 15,75% + Tris 100 mM (pH 8) + Tween 80 del 10% 5 min + NS1-P703P

Se ajustaron los volúmenes de todos los compuestos para tener al final 250-50-10 µg de NS1-P703P*-His en Tris 10 mM, 0,2% de Tween 80 y 3,15% de sacarosa. El vial se completó hasta un volumen 1,25X (reconstitución con 625 µl de diluyente, inyección de 500 µl).

Usando el aparato de liofilización Lyovac GT6, comprado a Steris (Alemania), se realizó el ciclo de liofilización durante 3 días de la forma siguiente:



4. Preparación de la formulación aceite en agua NS1-P703P*-His QS21/3D-MPL (SBAS2)

Se formuló el adyuvante como combinación de MPL y QS21, en una emulsión aceite/agua.

1) Composición de la formulación (volumen de la inyección 100 µl):

El grupo 1 recibió P703P*-His (20 µg) formulada en una combinación de MPL y QS21, en una emulsión aceite/agua. El grupo 2 recibió NS1-P703P*-His (25 µg) en una combinación de MPL y QS21,

44 (9)
X

en una emulsión aceite/agua.

2) Componentes

Componentes	Concentración (mg/ml)	Tampón
P703P-His	0,513	Fosfato 20 mM (pH 7,5)
NS1-P703P-His carboxi	0,846	Tris 20 mM + 0,2% de Tween 80 (pH 7,5)
SB62	2X	PBS (pH 6,8)
MPL	8,175	Agua
QS21	2	Agua
Tiomersal	0,2	Agua

3) Formulaciones

5 Las formulaciones se prepararon extemporáneamente el día de la inyección.

Las formulaciones que contenían 3D-MPL y QS21 en una emulsión aceite/agua (formulaciones SBAS2B; grupos 2 y 3) se prepararon de la forma siguiente: Se diluyeron P703P (20 µg) (grupo 2) y NS1-P703P*-His (25 µg) (grupo 3) en PBS concentrado a 10 veces (pH 6,8) y agua antes de la adición consecutiva, a intervalos de 5 minutos, de SB62 (50 µl), MPL (20 µg), QS21 (20 µg) y 1 µg de tiomersal/ml como conservante. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente con

agitación.

Las formulaciones sin adyuvante (grupos 4 y 5) se prepararon de la forma siguiente: Se diluyeron P703P (20 μ g) (grupo 4) y NS1-P703P^{*}-His (25 μ g) (grupo 5) en NaCl 1,5M y agua antes de la adición, a intervalos de 5 minutos, de 1 μ g de tiomersal/ml como conservante. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente con agitación.

La vacuna final se obtiene después de reconstituir la preparación liofilizada de NS1-P703P^{*}-His con el adyuvante o sólo con PBS.

Los controles de adyuvante sin antígeno se prepararon reemplazando la proteína por PBS.

EJEMPLO V

15 Inmunogenicidad usando proteína NS1-P703P^{*}-His

1. Inmunogenicidad de NS1-P703P^{*}-His en ratones

El objeto de este experimento fue caracterizar la respuesta inmunitaria inducida en ratones al vacunarlos con la molécula de NS1-P703P^{*}-His mutada recombinante purificada, producida en *E. coli*, en presencia o ausencia de adyuvante.

a) Protocolo de inmunización

Se vacunaron dos veces, a intervalos de 2 semanas, por vía intramuscular, grupos de 10 ratones Balb/c inmunocompetentes, de 6 a 8 semanas de edad, con 25 μ g de NS1-P703 mutada formulada con o sin SB AS02B (50 μ l de SB62/10 μ g de MPL/10 μ g de QS21). Catorce días después de la segunda inyección, se

extrajo sangre y se ensayó en el suero la presencia de anticuerpos anti-P703.

b) Respuesta de anticuerpos de IgG total

Se ensayó la respuesta de anticuerpos anti-P703 en el suero de los ratones catorce días después de la segunda vacunación. Esto se hizo mediante ensayo ELISA usando NS1-P703P* como antígeno de recubrimiento.

Se usaron extractos de *E. coli* para comprobar la posible presencia de anticuerpos contra contaminantes del huésped.

10 c) Resultados

Los resultados muestran que: 1) NS1-P703P* induce una respuesta inmunitaria mayor (IgG1) como se pone de manifiesto en el suero de ratones inyectados con la proteína NS1-P703P* sola, en comparación con el suero de ratones normales de control; 2) se encontraron títulos mayores de anticuerpos en animales que habían recibido la molécula de NS1-P703P* formulada en el adyuvante ASO2B.

También se midió el perfil isotípico de la respuesta de IgG específica de NS1-P703P. Como se muestra en la figura 8, se detectó IgG1 cuando los ratones recibieron la proteína NS1-P703P* sola; sin embargo, el perfil isotípico se desplazó hacia una respuesta TH1 (más IgG2a) por la presencia del adyuvante ASO2.

25 EJEMPLO VI

1. NS1-P703P-His

Se preparó NS1-P703-His de una manera análoga. Las secuencias de aminoácidos y del ADN se representan en las SEQ ID

Nos. 3 y 4.

En resumen, la estrategia para expresar una proteína de fusión NS1-P703P-His en *E. coli* incluyó las siguientes etapas:

- a) como material de partida, el mismo material de partida descrito en el ejemplo I (secuencia de aminoácidos 5 → 226 de p703pde5 descrita en la SEQ ID N° 8),
- b) amplificación PCR para flanquear los sitios de restricción de clonación de la secuencia no mutada de p703,
- c) inserción en un vector PMG81 (longitud igual a la del promotor pL) que contenía el gen NS1,
- d) transformación de la cepa receptora AR58 o AR120 y
- e) selección de la cepa recombinante.

La proteína resultante se puede purificar de una manera análoga a la proteína mutada NS1-P703P*-His. La estructura primaria de la proteína resultante tiene la secuencia descrita en la figura 9. La secuencia codificadora correspondiente a la proteína anterior se ilustra en la figura 10.

REFERENCIAS

- F. Abbas y P. Scardino, "The Natural History of Clinical Prostate Carcinoma", *Cancer*, 80, 827-833 (1997).
- D. Bostwick, A. Pacelli, M. Blute et al., "Prostate Specific
5 Membrane Antigen Expression in Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Adenocarcinoma", *Cancer*, 82, 2.256-2.261 (1998).
- M. Frydenberg, P. Stricker y K. Kaye, "Prostate Cancer Diagnosis and Management", *The Lancet*, 349, 1.681-1.687 (1997).
- C. Hackett, D. Horowitz, M. Wysocka y S. Dillon, *J. Gen.*
10 *Virology*, 73, 1.339-1.343 (1992).
- C.R. Kensil, S. Soltysik, U. Patel et al., *Vaccines 92*, edición de R.M. Channock, H.S. Ginsburg, F. Brown et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (N.Y.), 36-40 (1992).
- 15 P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Gelinas, L. Hood y K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serin protease with prostate restricted expression", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3.114-3.119 (1999).
- C. Pound, A. Partin, M. Eisenberg et al., "Natural History of
20 Progression after PSA Elevation following Radical Prostatectomy", *JAMA*, 281, 1.591-1.597 (1999).
- E. Ribí et al., *Microbiology 1986*, edición de L. Levine, P.F. Bonventre, J. Morello et al., American Society for Microbiology, Washington D.C., 9-13 (1986).
- 25 B.H. Xue, Y. Zhang, J. Sosman et al., "Induction of Human Cytotoxic T-Lymphocytes Specific for Prostate-Specific Antigen", *Prostate*, 30 (2), 73-78 (1997).

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

1. Una proteína prostasa, o un derivado de la misma, unida
5 a un acompañante de fusión.

2. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno prostasa se selecciona del grupo formado por la SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7 y SEQ ID N° 8.

3. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en
10 la que el acompañante de fusión es un acompañante de fusión inmunológico o un acompañante de fusión intensificador de la expresión.

4. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3, en la que el acompañante de fusión es la proteína NS1 del virus de
15 la gripe o un fragmento de la misma.

5. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el acompañante de fusión comprende además una marca de afinidad.

6. Una secuencia de un ácido nucleico que codifica una
20 proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un vector de expresión que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Una célula huésped transformada con una secuencia de un
25 ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 o con un vector de acuerdo con la reivindicación 7.

9. Una vacuna que contiene una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un ácido nucleico de

50 51

acuerdo con la reivindicación 6.

10. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende adicionalmente un adyuvante y/o una citoquina o quemoquina inmunoestimuladora.

5 11. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en la que la proteína se presenta en un vehículo del tipo de emulsión aceite en agua o agua en aceite.

10 12. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que el adyuvante comprende 3D-MPL, QS21, un oligonucleótido CpG o un éter o éster de polietileno.

13. Una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende adicionalmente uno o más de otros antígenos.

15 14. Una vacuna de acuerdo con las presentes reivindicaciones, para uso en medicina.

15. Uso de una proteína o de un ácido nucleico de acuerdo con las presentes reivindicaciones, para la fabricación de una vacuna para tratar inmunoterapéuticamente un paciente que padece cáncer u otros tumores asociados con una prostasa.

20 16. Un procedimiento para la producción de una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende transformar una célula huésped con una secuencia de un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, expresar la citada secuencia y aislar el producto deseado.

25 17. Un procedimiento para la producción de una vacuna, que comprende las etapas de purificar una proteína prostasa o un derivado de la misma por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16 y mezclar la proteína resultante de acuerdo

51 

con las presentes reivindicaciones con un adyuvante o diluyente adecuado o con otro excipiente farmacéuticamente aceptable.

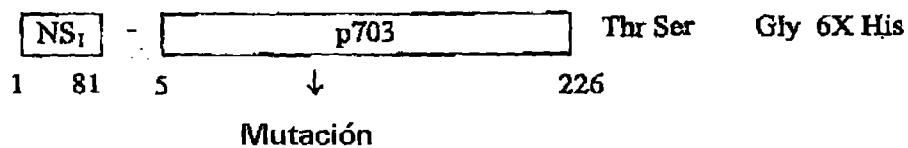
18. Un método de tratar pacientes susceptibles de padecer o que padecen cáncer de próstata, que comprende administrar a
5 los citados pacientes una cantidad farmacéuticamente activa de la vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 14.

VACUNA

RESUMEN

La presente invención se refiere a nuevas proteínas de la
5 familia de las prostasas y a su producción. En particular, la
invención se refiere a una proteína prostasa, o a un fragmento
de la misma, fusionada a un acompañante de fusión inmunológico,
como la proteína NS1. Dichos antígenos se pueden formular para
proporcionar vacunas para el tratamiento de tumores de la
10 próstata. También se proporcionan nuevos métodos para purificar
la proteína prostasa y homólogos de la misma.

Figura 1
Diseño de la proteína de fusión NS1-p703*-His
expresada en *E. coli*



54

Figura 2
Secuencia primaria de la proteína NS1-p703*-His
expresada en *E. coli*

MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVADQELGDAFFLDRLRRDQ 40
KSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMT 80
MVGEDCSPHSQPWQAALVMENELFCSGVLVHPQWVLSAAA 120
CFQNSYTI GLGLHSLEADQEPGSQMVEASLSVRHPEYNRP 160
LLANDLMLIKLDES VSESDTIRSI SIASQCPTAGNSCLVS 200
GWGLLANGRMPTVLQCVNVSVVSEEVCSKLYDPLYHPSMF 240
CAGGGQDQKDSCNGDSGGPLICNGYLQGLVSFGKAPCGQV 280
GVPGVYTNLCKFTEWIEKTVQASTSGHHHHHH. 312

Figura 3
 Secuencia de nucleótidos de NS1-p703 mutada-His
 (pRIT 14952)

ATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGATTGCT 40
 TTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACT 80
 AGGTGATGCCCCATTCCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAG 120
 AAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACcCTcGGTCTGGACA 160
 TCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGtGGAGCG 200
 GAttctGAAAGAAGAATCCGATGAGGCACTTAAAATGACC 240
 atgGTTGGGGAGGACTGCAGCCCGCACTCGCAGCCCTGGC 280
 AGGCGGCACTGGTCATGGAAAACGAATTGTTCTGCTCGGG 320
 CGTCCTGGTGCATCCGCAGTGGGTGCTGTCAGCCGCAgcg 360
 TGTTTCCAGAACTCCTACACCATCGGGCTGGGCCTGCACA 400
 GTCTTGAGGCCGACCAAGAGCCAGGGAGCCAGATGGTGGA 440
 GGCCAGCCTCTCCGTACGGCACCCAGAGTACAACAGACCC 480
 TTGCTCGCTAACGACCTCATGCTCATCAAGTTGGACGAAT 520
 CCGTGTCCGAGTCTGACACCATCCGGAGCATCAGCATTGC 560
 TTCGCAGTGCCCTACCGCGGGGAACTCTTGCCCTCGTTTCT 600
 GGCTGGGGTCTGCTGGCGAACGGCAGAATGCCTACCGTGC 640
 TGCAGTGCGTGAACGTGTCGGTGCTGTCTGAGGAGGTCTG 680
 CAGTAAGCTCTATGACCCGCTGTACCACCCCAGCATGTTC 720
 TGCGCCGGCGGAGGGCAAGACCAGAAGGACTCCTGCAACG 760
 GTGACTCTGGGGGGCCCCCTGATCTGCAACGGGTACTTGCA 800
 GGGCCTTGTTGTCTTTCGGAAAAGCCCCGTGTGGCCAAGTT 840
 GGCGTGCCAGGTGTCTACACCAACCTCTGCAAATTCACTG 880
 AGTGGATAGAGAAAACCGTCCAGGCCAGTactagtggcca 920
 ccatcaccatcaccattaa 939

Figura 4
Estrategia de clonación para producir
NS1-P703P^{*}-His en *E. coli*

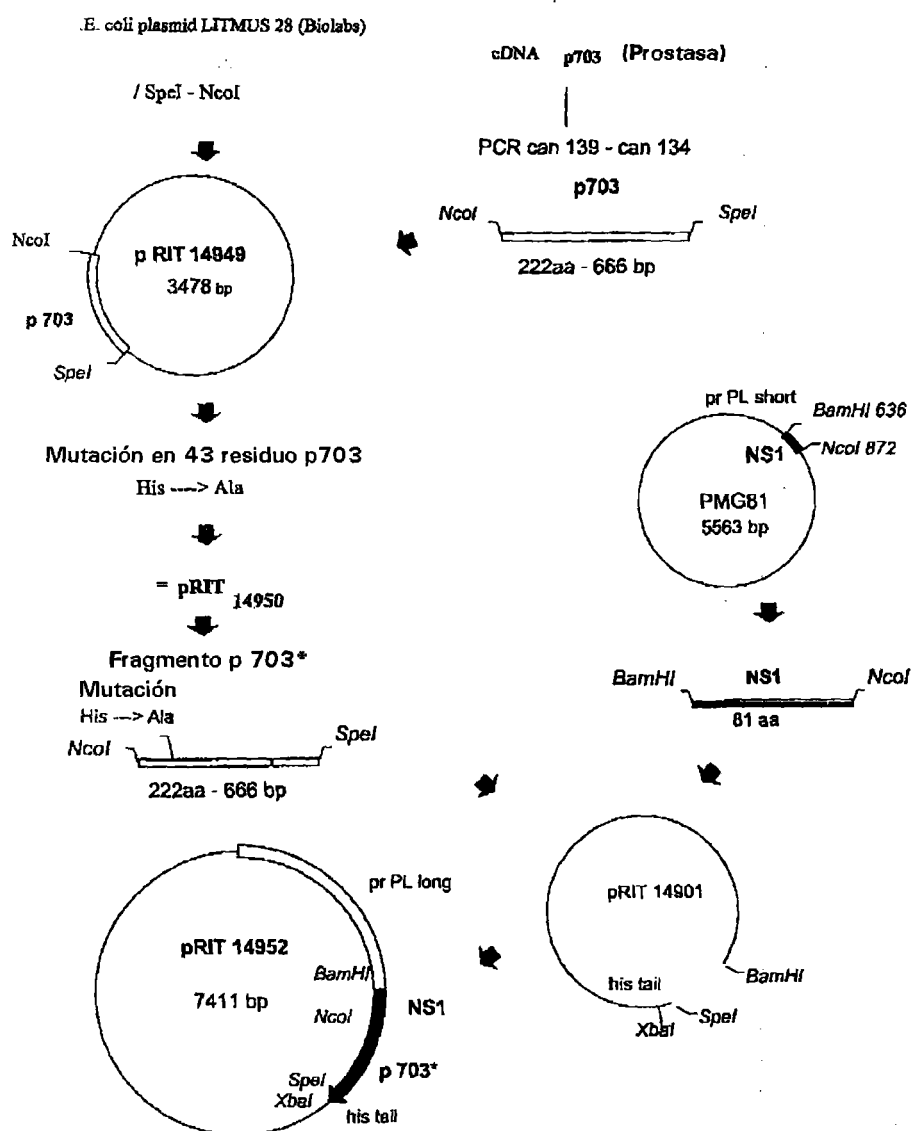
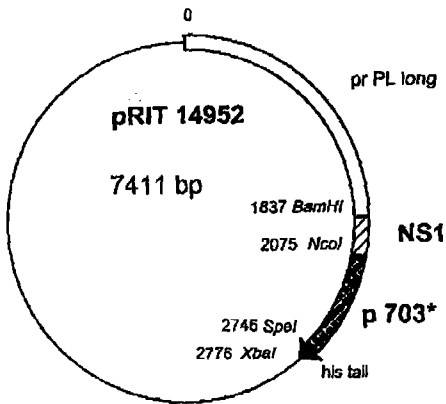


Figura 5
Mapa de plásmidos de pRIT 14952



58 ~~8~~

Figura 6

Procedimiento de fermentación de NS1-P703P⁺-His de E. coli

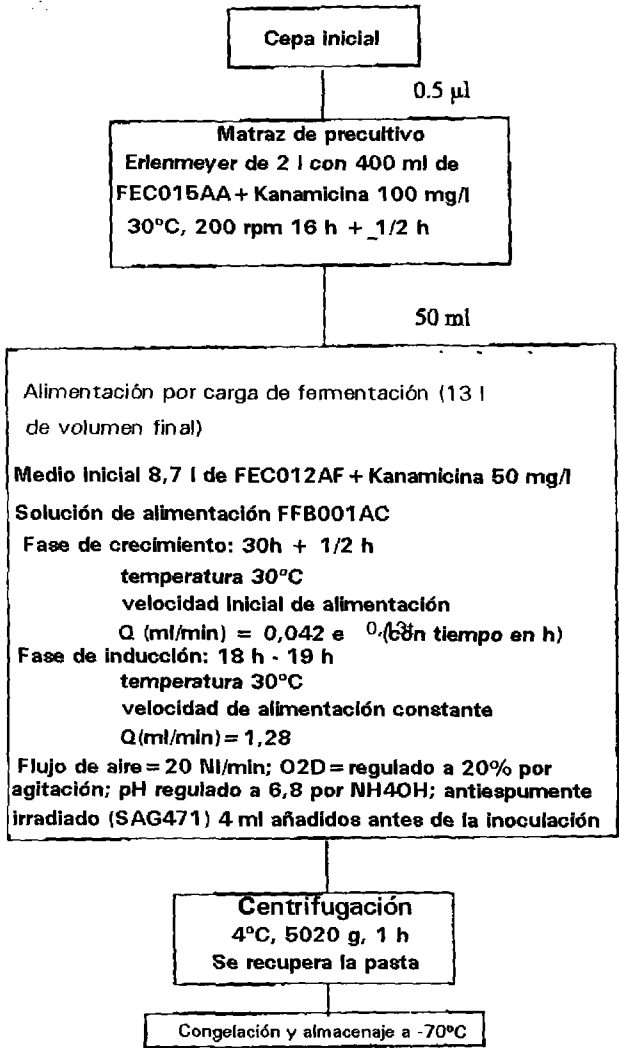


Figura 7

Procedimiento de purificación de NS1-P703P*-His de E. coli

Células congeladas

Homogenización Rannie DO 120.2 , 15000 psi
P 20 - Na Cl 2M EDTA 5mM pH 7,5

VMF Lavado de pastilla:
(membrana de 0,45 μ m) P 20 - Empi 0,5% pH 7,5
Solubilización/reducción:
Id. + GuHCl 4M-Glutación 20 mM
Microfiltración

Carboxiamidación 15', RT, yodoacetamida+200 mM

Quelación Ni sefarosa (+) Carga:
Tris 20-Urea 4M-Tween 0,5%-Im
20 mM pH 7,5
Elución:
Tris 20-Urea 4M-Tween 0,5%-Im
400 mM pH 7,5

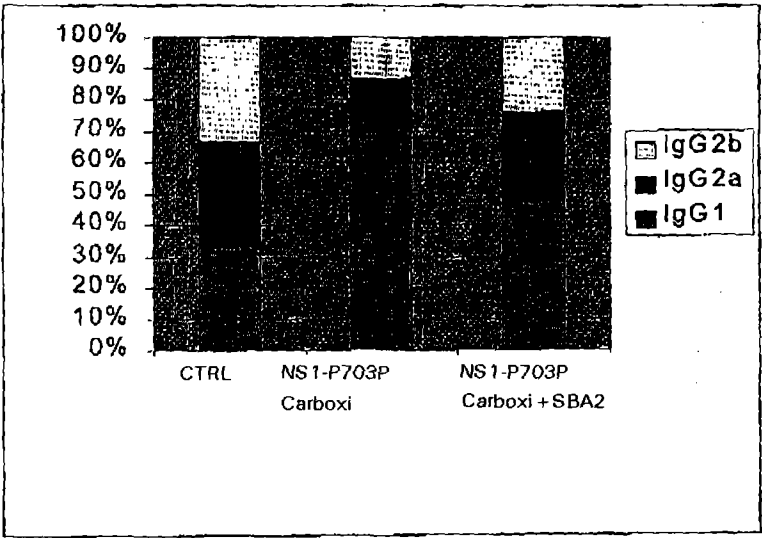
Sefarosa Q FF (+) Dilución y carga:
Tris 20-Urea 4M-Tween 0,5%-1%
pH 8,5
Elución:
Id. + Na Cl 250 mM

Ultrafiltración (Concentración 1000 μ m/ml)
(Membrana 10 Kd) Diafiltración:
Tris 20 pH 8,0

Filtración esterilizada
(Membrana de 0,22 μ m)

66
X

Figura 8
Inmunogenicidad de NS1-P703P* con adyuvante SBAS2



61 2

Figura 9
Secuencia primaria de la proteína NS1-p703-His
expresada en *E. coli*

MDPNTVSSSFQVDCFLWHVRKR VADQELGDAFFLDRLRRDQ 40
KSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILKEESDEALKMT 80
MVGEDCSPHSQPWQAALVMENELFCSGVLVHPQWVLSAAH 120
CFQNSYTIGLGLHSLEADQEPGSQMVEASLSVRHPEYNRP 160
LLANDLMLIKLDES VSES DTIRSI SIASQCPTAGNSCLVS 200
GWGLLANGRMPTVLQCVNVSVVSEEVCSKLYDPLYHPSMF 240
CAGGGQDQK DSCNGDSGGPLICNGYLQGLVSEFGKAPCGQV 280
GVPGVYTNLCKFTEWIEKTVQASTSGHHHHH. 313

Figura 10
Secuencia de nucleótidos de NS1-p703-His

```

ATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGATTGCT 40
TTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAAGT 80
AGGTGATGCCCCATTCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAG 120
AAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGCACcCTcGGTCTGGACA 160
TCGAGACAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGtGGAGCG 200
GAttctGAAAGAAGAATCCGATGAGGCACTTAAATGACC 240
atgGTTGGGGAGGACTGCAGCCCGCACTCGCAGCCCTGGC 280
AGGCGGGCACTGGTCATGGAAAACGAATTGTTCTGCTCGGG 320
CGTCCTGGTGCATCCGCASTGGGTGCTGTCAGCCGCacac 360
TGTTTCCAGAACTCCTACACCATCGGGCTGGGCCTGCACA 400
GTCTTGAGGCCGACCAAGAGCCAGGGAGCCAGATGGTGGA 440
GGCCAGCCTCTCCGTACGGCACCCAGAGTACAACAGACCC 480
TTGCTCGCTAACGACCTCATGCTCATCAAGTTGGACGAAT 520
CCGTGTCCGAGTCTGACACCATCCGGAGCATCAGCATTGC 560
TTCGCASTGCCCTACCGCGGGGAACCTTTGCCCTCGTTTCT 600
GGCTGGGGTCTGCTGGCGAACGGCAGAATGCCTACCGTGC 640
TGCAGTGCGTGAAACGTGTGCGTGGTGTCTGAGGAGGTCTG 680
CAGTAAGCTCTATGACCCGCTGTACCACCCAGCATGTTC 720
TGCGCCGGCGGAGGGCAAGACCAGAAGGACTCCTGCAACG 760
GTGACTCTGGGGGGCCCCCTGATCTGCAACGGGTACTTGCA 800
GGCCCTTGTGTCTTTCCGAAAAGCCCCGTGTGGCCAAGTT 840
GGCGTGCCAGGTGTCTACACCAACCTCTGCAAATTCACTG 880
AGTGGATAGAGAAAACCGTCCAGGCCAGTactagtggcca 920
ccatcaccatcaccattaa 939

```

63
64

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Cabezon Teresa
Dillon Davin
- <120> Fusión de la proteasa
- <130> B45222
- <160> 8
- <170> FastSEQ para Windows versión 3.0
- <210> 1
- <211> 312
- <212> PRT
- <213> Humano
- <400> 1

```

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

```


64
L
XO

Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gln	Asp	Gln	Lys	Asp	Ser	Cys	Asn	Gly	Asp	Ser
				245					250					255	
Gly	Gly	Pro	Leu	Ile	Cys	Asn	Gly	Tyr	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Ser	Phe
			260					265						270	
Gly	Lys	Ala	Pro	Cys	Gly	Gln	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Asn
		275					280					285			
Leu	Cys	Lys	Phe	Thr	Glu	Trp	Ile	Glu	Lys	Thr	Val	Gln	Ala	Ser	Thr
	290					295					300				
Ser	Gly	His	His	His	His	His	His								
305						310									

<210> 2
<211> 939
<212> ADN
<213> Humano
<400> 2

```

atggatccaa acactgtgtc aagctttcag gtagattgct ttctttggca tgtccgcaaa
60
cgagttgcag accaagaact aggtgatgcc ccattccttg atcggcttcc ccgagatcag
120
aaatccctaa gaggaagggg cagcaccctc ggtctggaca tcgagacagc caccgtgtct
180
ggaaagcaga tagtggagcg gattctgaaa gaagaatccg atgaggcact taaaatgacc
240
atggttgggg aggaactgcag ccgcactccg cagccctggc agsgggcact ggtcatggaa
300
aacgaattgt tctgtcggg cgtcctggcg catccgcagt gggctgtgtc agccgcagcg
360
tgtttccaga acctctacac catcgggctg ggcctgcaca gtcttgaggc cgaccaagag
420
ccaggggagcc agatgggtgga ggcacgcctc tccgtacggc acccagagta caacagaccc
480
ttgtctgcta acgacctcat gctcatcaag ttggaagaa cctgttccga gtctgacacc
540
atccggagca tcagcattgc ttgcagtcgc cctaccggcg ggaactcttg cctcgtttct
600
ggctgggggc tgcggcgaa cggcagaatg cctaccgtgc tgcagtgcgt gaacgrgtcg
660
gtggtgtctg aggaggtctg cagtaagctc tatgacccgc tgtaccaccc cagcatgttc
720
tgcgcggcg gagggcaaga ccagaaggac tccgtcaacg gtgactctgg ggggcccctg
780
atctgcaacg ggtacttgca gggccttgcg tctttcggaa aagcccctg tggccaagtt
840
ggcgtgccag gtgtctacac caacctctgc aaattcactg agtggataga gaaaaccgtc
900
caggccagta ctagtggcca ccatcaccat caccattaa
939

```

<210> 3
 <211> 312

<212> PRT
 <213> Humano
 <400> 3

```

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

```

<210> 4
 <211> 939
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 4

67

atggatccaa acactgtgtc aagctttcag gtagattgct ttctctggca tgtccgcaaa
60
cgagttgcag accaagaact aggtgatgcc ccattccttg atcgggttcg ccgagatcag
120
aaatccctaa gaggaagggy cagcacctc ggtctggaca tcgagacagc cacacgtgct
180
ggaaagcaga tagtggagcg gattctgaaa gaagaatccg atgaggcact taaatgacc
240
atggttgggg aggactgcag ccgcactcg cagccctggc aggcggcact ggtcatggaa
300
aacgaattgt tctgtctggg cgtcctggtg catccgcagt ggggtgctgc agccgcacac
360
tgtttccaga actcctacac catcgggtcg ggcctgcaca gtcttgaggc cgaccaagag
420
ccaggagcgc agatgggtga ggccagctc tccgtacggc acccagagta caacagacc
480
ttgctcgta acgacctcat gtcctcaag ttggaagaa cctgtctcga gtctgacacc
540
atccgagca tcagcattgc ttgcagtg cctaccgcg ggaactcttg cctcgttctt
600
ggctggggtc tctggcgaa cggcagaatg cctaccgtgc tgcagtgctg gaacgtgtcg
660
gtggtgtctg aggaggtctg cagtaagctt tatgaccgcg tgtaccacc cagcatgtc
720
tcgcgcggcg gagggcaaga ccagaaggac tctgcaacg gtgactctgg gggggccctg
780
atctgcaacg ggtacttgca gggccttggt tctttcgaa aagcccggtg tggccaagtt
840
ggcgtgccag gtgtctacac caacctctgc aaattcactg agtggataga gaaaaccgtc
900
caggccagta ctagtggcca ccatcaccat caccattaa
939

68 26

<210> 5
<211> 232
<212> PRT
<213> Humano

Asn	Ser	Ala	Arg	Ala	His	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Leu	Val	Met
1				5					10					15	
Glu	Asn	Glu	Leu	Phe	Cys	Ser	Gly	Val	Leu	Val	His	Pro	Gln	Trp	Val
			20					25					30		
Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Gln	Lys	Xaa	Val	Gln	Ser	Ser	Tyr	Thr
			35					40				45			
Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	His	Ser	Leu	Glu	Ala	Asp	Gln	Glu	Pro	Gly	Ser
	50					55					60				
Gln	Met	Val	Glu	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Arg	His	Pro	Glu	Tyr	Asn	Arg
65					70					75					80
Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Asp	Leu	Met	Leu	Ile	Lys	Leu	Asp	Glu	Ser	Val
				85						90				95	
Ser	Glu	Ser	Asp	Thr	Ile	Arg	Ser	Ile	Ser	Ile	Ala	Ser	Gln	Cys	Pro

	100		105		110										
Thr	Ala	Gly	Asn	Ser	Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Leu	Leu	Ala	Asn
	115		120		125										
Gly	Arg	Met	Pro	Thr	Val	Leu	Gln	Cys	Val	Asn	Val	Ser	Val	Val	Ser
	130		135		140										
Glu	Glu	Val	Cys	Ser	Lys	Leu	Tyr	Asp	Pro	Leu	Tyr	His	Pro	Ser	Met
	145		150		155										
Phe	Cys	Ala	Gly	Gly	Gln	Asp	Gln	Lys	Asp	Ser	Cys	Asn	Gly	Asp	
	165		170		175										
Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ile	Cys	Asn	Gly	Tyr	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Ser
	180		185		190										
Phe	Gly	Lys	Ala	Pro	Cys	Gly	Gln	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr
	195		200		205										
Asn	Leu	Cys	Lys	Phe	Thr	Glu	Trp	Ile	Glu	Lys	Thr	Val	Pro	Gly	Gln
	210		215		220										
Leu	Thr	Leu	Gly	Thr	Gly	Asn	Pro								
	225		230												

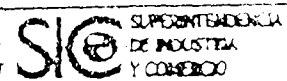
<210> 6
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Humano
 <400> 6

Met	Trp	Phe	Leu	Val	Leu	Cys	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Gly
1			5					10					15		
Ala	Ala	Pro	Pro	Ile	Gln	Ser	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Trp	Glu	Cys	Glu
		20					25					30			
Gln	His	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Leu	Val	Met	Glu	Asn	Glu	Leu
	35				40						45				
Phe	Cys	Ser	Gly	Val	Leu	Val	His	Pro	Gln	Trp	Val	Leu	Ser	Ala	Ala
	50				55					60					
His	Cys	Phe	Gln	Asn	Ser	Tyr	Thr	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	His	Ser	Leu
	65			70					75				80		
Glu	Ala	Asp	Gln	Glu	Pro	Gly	Ser	Gln	Met	Val	Glu	Ala	Ser	Leu	Ser
		85						90					95		
Val	Arg	His	Pro	Glu	Tyr	Asn	Arg	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Asp	Leu	Met
	100						105					110			
Xaa	Ile	Lys	Leu	Asp	Glu	Ser	Val	Ser	Glu	Ser	Asp	Asn	Ile	Arg	Xaa
	115					120					125				
Ile	Ser	Ile	Xaa	Ser	Gln	Cys	Pro	Thr	Ala	Gly	Asn	Phe	Cys	Leu	Val
	130				135						140				
Ser	Gly	Trp	Gly	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Arg	Met	Pro	Thr	Val	Leu	Gln
	145			150				155						160	
Cys	Val	Asn	Val	Ser	Val	Val	Ser	Glu	Glu	Val	Cys	Ser	Lys	Leu	Tyr
		165						170						175	
Asp	Pro	Leu	Tyr	His	Pro	Ser	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Gln	Asp
		180					185					190			
Gln	Lys	Asp	Ser	Cys	Asn	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ile	Cys	Asn
	195				200						205				
Gly	Tyr	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Lys	Ala	Pro	Cys	Gly	Gln
	210				215						220				

Se retiraron los folios 74 y 75.
de tarjetas

202016.

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

(71) SOLICITANTE:

(30) PRIORIDAD:

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
CORIXA CORPORATION

(31) No. DE SOLICITUD: 09/352.616-09/439.313

(72) INVENTORES:

09/443686-09/483.672

TERESA CABEZON SILVA

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN: Jul.13/99-Nov.12/99
Nov.18/99-Feb.14/00

Davin Clifford DILLON

(33) PAÍS:

E.U.A.

(74) APODERADO:

GERMAN CASTILLO GRAU

(54) TÍTULO: VACUNA

(57) RESUMEN:

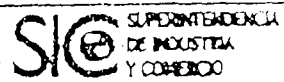
1. Una proteína prostasa, o un derivado de la misma, unida a un acompañante de fusión.

2. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno prostasa se selecciona del grupo formado por la SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7 y SEQ ID N° 8.

12. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que el adyuvante comprende 3D-MPL, QS21, un oligonucleótido CpG o un éter o éster de polietileno.

15. Uso de una proteína o de un ácido nucleico de acuerdo con las presentes reivindicaciones, para la fabricación de una vacuna para tratar inmunoterapéuticamente un paciente que padece cáncer u otros tumores asociados con una prostasa.

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION



72

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

(71) SOLICITANTE:

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD: 09/536.857-No se conoce aún-No se conoce aún-No se conoce aún-No se conoce aún-0015747.9

(72) INVENTORES:

(32) FECHA DE

PRESENTACIÓN: Marzo 27/00-Mayo 9/00-Mayo 12/00-Junio 13/00-Junio 27/00-Junio 27/00

(33) PAÍS: E.U.A. - INGLESA (74) APODERADO:

(54) TÍTULO:

(57) RESUMEN:



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

73

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 43,072
FECHA : JULIO 12 DE 2000

REGISTRADO: 2882857
FECHA: 12/07/2000
TABLA: 1 300 400000000
DEPARTAMENTO: BOGOTÁ

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTÁ	050-00110-6	2882857	6,594,000.00

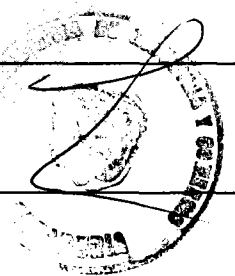
***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.
PRIMER EXAMEN DE FORMA.

430
2000 - 11 - 01**Radicación No. 00-52321****Concepto Técnico No. 1731****ICP: A61K 38/48, A61K 35/48, A61K 45/05, C07K19/00, C12N 15/62.**

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|--|--|
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del inventor (Art. 8, Art 13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del solicitante (Art. 13-a) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art. 13-e) |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art. 13-b) |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art. 13-c) |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene los dibujos correctos (Art. 14-c junto con el literal d) del Art. 4 del (Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art. 14-c junto con el Dto. 3464 del 26 de diciembre de 1980) |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art. 13-d). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 del 94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P-104) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☐ NO ☒ | CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA. |

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA:

1. El título de la invención es muy general, pues "VACUNA" no permite establecer sobre que tipo de compuestos versa la invención. Por tanto, se recomienda que se modifique el título de manera que corresponda con las reivindicaciones de la solicitud, una posibilidad es que dicho título sea "proteínas de fusión que comprenden prostasa".
2. El término "fusión inmunológico" no es propio del área de la invención, sírvase revisar este término y realizar las modificaciones correspondientes.
3. La figura 8 contenidas en el folio 61 no es lo suficientemente nítidas para permitir una buena copia a través de Offset o Scanner y permitir observar los resultados que se desean demostrar con esa figura. Sírvase presentar una nueva copia con mejor resolución.

4. La reivindicación 1 no es clara puesto que en ella no se definen las características de la invención, además el término "derivado" es ambiguo y no precisa cual es el objeto de la invención. Teniendo en cuenta el contenido del resumen y de la descripción se recomienda modificar la reivindicación 1 para que en ella se diga que el objeto de la invención es una proteína de fusión que se caracteriza por comprender la proteína prostasa unida a una proteína de fusión inmunológico (lo que sea que significa este término) o unida a un intensificador de la expresión (aclarando la expresión de que proteína es la que intensifica dicho intensificador).
5. La reivindicación 20 no es clara, ella no define de manera precisa el objeto de la invención y por ende no cumple con el literal d) del artículo 13 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena donde se indica que: *"Las solicitudes para obtener patentes de invención deberán presentarse ante la oficina nacional competente y deberán contener: Una o más reivindicaciones que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente"*. Es un hecho que un antígeno, en este caso la proteína de fusión, puede unirse o enlazarse específicamente a más de un anticuerpo, por consiguiente, decir que el anticuerpo que se desea proteger es aquel que se une de manera específica a la proteína... no es suficiente información para establecer de manera precisa cual es el objeto para el que el solicitante desea protección. Siendo que un anticuerpo es una proteína, se requiere que para lograr establecer de forma exacta cual es el objeto de la invención que dicho anticuerpo sea definido en función de la secuencia de aminoácidos que constituyen dicha proteína o del número de depósito mediante el cual se puede acceder a dicho anticuerpo, de lo contrario se requiere que se elimine la reivindicación que hagan mención del anticuerpo pues sin los datos mencionados ella no precisa el objeto de la invención.
6. Si se realiza la modificación de la reivindicación 1 tenga en cuenta dicho cambio para la redacción de la reivindicación 17 puesto que el procedimiento comprendería la etapa de purificar la proteína de fusión y no la proteína prostasa.

EXAMINADOR TÉCNICO: 202016.

Bogotá, D.C., 01 de noviembre de 2000

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante 1 []
- Nombre e identificación del Inventor 1 []
- Título o nombre de la Invención 1 []
- Descripción 6 []
- Reivindicaciones 50 []
- Resumen 53 []
- Comprobante de Pago 78 []

COMPLETA []

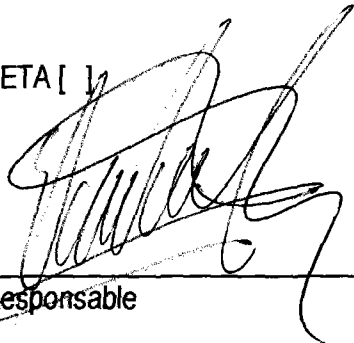
INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha

SECRETARIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
CARRERA 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Código Postal: 221-21-2-3-4
Teléfono: 281 31 25 Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Commutador: 384 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-52321

Fecha: 8 de Noviembre del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 3 de septiembre de 1999,
del folio 109057 al folio 109066 del
libro de Protocolo N^o 389, obra el poder
N^o 10663 conferido por CORIXA
CORPORATION

domiciliado(a) en Seattle, estado de
Washington, Estados Unidos de América

al doctor GERMAN CASTILLO GRAU Y/O ADRIANA
CASTILLO GIBSON Y/O LUIS FELIPE CASTILLO
GIBSON.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos.

Facultad para desistir y sustituir si.

Revisado.



INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-52321.

Fecha: 8 de Noviembre del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 12 de julio de 1996,
del folio 86.459 al folio 86.464 del
libro de Protocolo N^o 298, obra el poder
N^o 16.769 conferido por SMITHKLINE
BEECHAMAN BIOLOGICALS S.A.

domiciliado(a) en Rixensart - Bélgica

al Gestor GERMAN CASTILLO GRAU y/o ADRIANA
CASTILLO GIBSONE y/o LUIS FELIPE CASTILLO
GIBSONE.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos.

Facultad para desistir SI.

Revisado _____.



DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-52321

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

SI ☒] NO ☐] NO APLICABLE ☐] Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI ☒] NO ☐] NO APLICABLE ☐] Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI ☒] NO ☐] NO APLICABLE ☐] Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000)

SI ☒] NO ☐] EXTEMPORANEAMENTE ☐] Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI ☐] NO ☒] NO APLICABLE ☐] Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI ☐] NO ☒] NO APLICABLE ☐] Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI ☒] NO ☐] CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: los derechos de prioridad reivindicados en la presente solicitud se pierden, debido a que no presentó, dentro de los tres (3) meses siguientes contados a partir de la fecha de depósito de la presente solicitud, copia certificada su conformidad por la Administración que recibió las solicitudes de las cuales reivindica prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☒] NO ☐] Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☒] NO ☐] Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Bogotá, D.C., 8 de Noviembre del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.

202022



Industria y Comercio

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES DEPENDENCIA

430
2000-11-20

EXPEDIENTE 00-52321

AUTO 3964

LA JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE:

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor GERMAN CASTILLO GRAU como apoderado de las Sociedades solicitantes, en los términos y para los efectos del poder conferido.

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Bogotá D.C., a los _____

LA JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Bogotá D.C., _____ notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia