

**VACUNACIÓN CON EL DOMINIO ALFA 3 DE MICA/B PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER****SOLICITUDES RELACIONADAS**

5                    Esta solicitud reclama la prioridad y el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nos. 62/263,377, presentada el 4 de diciembre de 2015, y 62/422,454, presentada el 15 de noviembre de 2016, los contenidos de cada una de ellas se incorporan por referencia en su totalidad.

10                   **INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS COMO REFERENCIA**

                    El contenido del archivo de texto denominado "DFCI-126-001WO-Sequence Listing.txt", que se creó el 2 de diciembre de 2016 y tiene un tamaño de 30.9 KB, se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

15                   **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

                    La presente invención se refiere en general a la composición y a los métodos para inducir una respuesta inmune antitumoral en un sujeto.

20                   **INTERESES GUBERNAMENTALES**

                    Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo R01CA173750 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

25                   **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

                    Los recientes avances en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer han demostrado la capacidad de nuestro sistema inmunitario para erradicar incluso los cánceres avanzados. Estas terapias están cambiando rápidamente la cara del tratamiento del cáncer. A  
30 diferencia de las terapias con anticuerpos monoclonales que requieren la administración repetida de anticuerpos para prevenir la recaída del tumor, las vacunas pueden inducir memoria inmunológica endógena y, por lo tanto, tienen el potencial de proporcionar protección a largo plazo.

                    La selección de antígenos para la terapia con vacunas requiere una comprensión exhaustiva del papel biológico de los antígenos candidatos en el crecimiento del tumor y sus niveles  
35 de expresión por las células tumorales en comparación con los tejidos normales. MICA y la proteína

MICB estrechamente relacionada (abreviada como MIC) son antígenos que están ausentes o se expresan en niveles muy bajos por las células normales, pero están ampliamente regulados en exceso por una variedad de cánceres diferentes secundarios al daño genómico. MIC es un ligando importante para el receptor NKG2D en linfocitos citotóxicos, específicamente células NK, células T CD8 y células T gamma-delta. La expresión de MIC se dirige a tales células para su eliminación por el sistema inmune. Sin embargo, muchos tumores escapan de esta importante vía de vigilancia inmunológica al desprender MIC de la superficie celular, un procedimiento en el que el dominio alfa 3 de MIC se despliega mediante la disulfuro isomerasa ERp5, lo que lo hace sensible a la escisión mediante metaloproteasas de matriz como ADAM 10 y ADAM 17. El desprendimiento de MIC provoca la sub-regulación del receptor NKG2D en las células NK y células T CD8. Por lo tanto, la escisión proteolítica transforma una proteína inmunoestimulante en una sustancia inmunosupresora. Por lo tanto, existe una necesidad de compuestos para inhibir el desprendimiento de MICA.

15

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

En diversos aspectos, la invención proporciona composiciones de vacuna que incluyen como componente inmunogénico, una cantidad eficaz de un péptido que incluye el dominio alfa 3 de MIC. Por cantidad efectiva se entiende una cantidad efectiva para provocar una respuesta inmune contra el dominio alfa 3 de MIC.

El dominio alfa 3 de MIC es un dominio alfa 3 de MICA o MICB. Opcionalmente, el dominio alfa 3 de MIC no está glicosilado. Preferiblemente, el péptido incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En diversos aspectos, la composición de vacuna comprende una pluralidad de péptidos. En algunos aspectos, el péptido se conjuga con una proteína portadora.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que tiene una proteína de subunidad de ferritina monomérica unida a una proteína de dominio alfa 3 de MIC. La proteína de la subunidad de ferritina monomérica tiene un dominio que permite que la proteína de fusión se autoensamble en nanopartículas. En una modalidad preferida, la subunidad monomérica es una proteína de ferritina de *Helicobacter pylori*. Opcionalmente, la proteína de fusión se conjuga adicionalmente con un oligonucleótido CpG.

En otro aspecto más, la invención proporciona una nanopartícula que incluye la proteína de fusión de acuerdo con la invención. La nanopartícula incluye una pluralidad de péptidos del dominio alfa 3 de MIC.

35

En otro aspecto más, la invención proporciona una composición de vacuna que

comprende la nanopartícula de acuerdo con la invención. La composición de vacuna puede comprender además GM-CSF.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto mediante la administración a un sujeto de una composición de vacuna de acuerdo con la invención. Opcionalmente, la composición de vacuna contiene GM-CSF. El sujeto ha dado positivo para desprender MIC en su suero. La composición de vacuna se administra como parte de un régimen terapéutico. Un régimen terapéutico incluye, por ejemplo, radioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia o quimioterapia. Opcionalmente, al sujeto se le administra adicionalmente una o más vacunas específicas para un antígeno distinto de un antígeno de dominio alfa 3 de MIC.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar el cáncer mediante la administración al sujeto de una vacuna que comprende células que expresan el dominio alfa 3 de MIC. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar el cáncer en el que se induce una respuesta inmune contra el MIC mediante el uso de un virus replicante o no replicante.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que es comúnmente entendido por un experto en la técnica al cual compete esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden utilizarse en la práctica de la presente invención, materiales y métodos adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionados expresamente están incorporadas por referencia en su totalidad. En casos de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, tendrá control. Además, los materiales, métodos y ejemplos descritos en la presente sólo son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes y abarcadas por la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1A es un esquema que demuestra la interacción entre el homodímero NKG2D y MICA. El dominio alfa 3 de MICA se identifica como referencia. De: Nat Immunol. 2001 Mayo;2(5):443-51. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA.

La figura 1B es un esquema que demuestra un mecanismo a través del cual los tumores escapan a la vigilancia inmune a través del desprendimiento de MIC de la superficie de las células tumorales.

La figura 1C es un esquema que representa una partícula de ferritina.

La figura 1D es un esquema que representa un mapa que demuestra la respuesta inmune celular y humoral contra la ferritina humana y de ratón.

La figura 2A es un esquema de la construcción del gen de fusión de ferritina alfa 3 de MICA.

La figura 2B es (izquierda) un cromatograma de exclusión por tamaño de ferritina alfa 3 de MICA usando la columna XK16/60 Superdex200 (Caudal: 2 ml/min; regulador de pH de ejecución: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.7.5). La figura 2B representa además (derecha) un gel de SDS en condiciones reductoras que contienen muestras que se recogieron entre 22 y 27 minutos en el pico de proteína.

La figura 2C es un esquema de la construcción de alfa 3 de MICA desglucosilada.

La figura 2D es (izquierda) un cromatograma de exclusión de tamaño de alfa 3 de MICA usando la columna Superdex200 (caudal: 1ml/min; regulador de pH de ejecución: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.7.5). La figura 2D representa además (derecha) un gel de SDS en condiciones reductoras que contienen muestras que se recogieron entre 16 y 20 minutos en el pico de proteína.

La figura 3 es un esquema que representa el uso de la vacuna de barras de sílice mesoporosas (MSR) para inyección subcutánea, y la inducción resultante de respuestas inmunes potentes. Véase Kim, J & Aileen, W.L. et al. Nature Biotech. 2015.

Las figuras 4A y 4B son una serie de gráficos que muestran la eficacia de la vacuna de dominio  $\alpha 3$  de MIC en un modelo de metástasis pulmonar. Los datos presentados en la figura 4A se obtuvieron de la siguiente manera. Los ratones B6 se inmunizaron con 200 $\mu$ g de proteína  $\alpha 3$  de MIC, 1 $\mu$ g de GM-CSF y 100 $\mu$ g de CpG-ODN, ya sea como un bolo sin andamio (bolo) o dentro del andamio de barras de sílice mesoporoso (MSR) (vacuna MSR). Los ratones recibieron una inyección de refuerzo el día 28. Tres semanas después, los ratones fueron desafiados por inyección i.v. de 5X10<sup>5</sup> células tumorales B16-MIC. El número de metástasis pulmonares se cuantificó el día 14 después de la inyección de la célula tumoral. Los datos obtenidos en la figura 4B se obtuvieron de la siguiente manera. El desprendimiento de MIC se cuantificó mediante ELISA los días 0, 5 y 13 después de la inyección de la célula tumoral. Experimentos previos habían demostrado que los anticuerpos específicos del dominio  $\alpha 3$  de MIC no interfieren con ELISA utilizado para detectar el MIC desprendido.

Las figuras 5A y 5B son una serie de gráficos y gráficas que demuestran que la vacunación con proteína de fusión de ferritina MICA induce títulos elevados de anticuerpos específicos de MICA. La figura 5A representa un gráfico de FACS de anticuerpos específicos de  $\alpha 3$  de MICA en los sueros de ratones inmunizados con MICA de longitud completa expresado en la superficie de células de melanoma de ratón B16F10. Las células de melanoma B16F10 se

transfectaron con ADNc de MICA humano (alelo 009) y luego se marcaron con anticuerpo de control de isotipo (control negativo) o una concentración de saturación de un mAb murino específico para MICA (6D4, control positivo). Este sistema se usó luego para analizar sueros de ratones vacunados con ferritina  $\alpha 3$  de MICA o un antígeno de control (OVA). Se utilizó un anticuerpo IgG anti-ratón secundario marcado con PE para detectar anticuerpos unidos a la superficie celular. La fluorescencia fue cuantificada por FACS. Se detectó una fuerte tinción incluso con 1  $\mu$ l de suero de ratones en los días 14-42 después de la vacunación. La figura 5B representa un gráfico de barras de la intensidad de fluorescencia media (MFI) que representa  $\pm$  SD de 3 réplicas de unión de anticuerpos específicos de  $\alpha 3$  de MICA en los sueros de ratones inmunizados a MICA de longitud completa expresado en la superficie de células de melanoma de ratón B16F10.

La figura 6 es una serie de gráficos que representan los sueros probados de ratones inmunizados con ferritina MICA que se ensayaron mediante ELISA para determinar las diferentes subclases de IgG inducidas tras la vacunación.

La figura 7 es un gráfico que demuestra que los anticuerpos séricos en el grupo inmunizado con ferritina MICA previenen el desprendimiento de MICA de la superficie de la célula tumoral.

Las figuras 8A y 8B son una serie de gráficos que representan la actividad terapéutica de la vacuna de ferritina MICA. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con MICA  $\alpha 3$  - ferritina u ovoalbúmina y recibieron una inyección de refuerzo el día 28. Los ratones se expusieron mediante inyección intravenosa de  $5 \times 10^5$  células tumorales B16-MICA que forman metástasis pulmonares. El número de metástasis pulmonares se contaron el día 14 (figura 8A) y el MICA desprendido se cuantificó en el suero (figura 8B). La vacuna del dominio  $\alpha 3$  de MICA redujo sustancialmente el número de metástasis pulmonares mientras que la vacuna de control no tuvo efecto. Además, el MICA desprendido se volvió indetectable en el suero de los ratones que habían recibido la vacuna de ferritina  $\alpha 3$  MICA mientras que los niveles de MICA desprendido eran muy altos en ambos grupos de control. La figura 8A demuestra que la inmunización con ferritina alfa 3 de MICA previene la metástasis en comparación con controles sin tratamiento, o animales que recibieron inyección de proteína OVA. La figura 8B es un gráfico que demuestra los resultados obtenidos mediante ELISA que indican que los ratones vacunados tenían niveles indetectables de sMICA (MICA desprendido) en los sueros.

Las figuras 9A a 9C son una serie de gráficos que representan el título de anticuerpos inducidos por la vacuna de ferritina MICA (figura 9A), así como el efecto de la dosificación de la vacuna sobre el número de nódulos pulmonares (figura 9B) y en la cantidad de sMICA (figura 9C).

Las figuras 10A y 10B son una serie de gráficos que representan el efecto de la

versión desglucosilada de la vacuna  $\alpha 3$  de MICA (no enlazada a la nanopartícula de ferritina) sobre la unión de anticuerpos específicos de  $\alpha 3$  de MICA en los sueros de ratones inmunizados a MICA de longitud completa expresado en la superficie de células de melanoma de ratón B16F10 ensayadas mediante citometría de flujo (figura 10A), así como gráficos que representan los resultados de los  
 5 ensayos ELISA que se usaron para determinar las diferentes subclases de IgG inducidas tras la vacunación (figura 10B).

Las figuras 11A y 11B son una serie de gráficos que representan la vacuna  $\alpha 3$  de MICA sola (sin fusión de ferritina) que tiene un beneficio terapéutico significativo in vivo. La figura 11A es un gráfico que representa el número de metástasis pulmonares después de la vacunación con  
 10 la vacuna  $\alpha$  de MICA sola. La figura 11B es un gráfico que representa la cantidad de sMICA en el suero el día 0, día 5 y día 13 después de la vacunación con la vacuna  $\alpha$  de MICA sola.

Las figuras 12A y 12B muestran que la vacuna de ferritina MICA retrasa el crecimiento del tumor en el modelo de melanoma subcutáneo B16F10. En la figura 12A, se inmunizaron ratones hembras C57BL/6 de 7 semanas de edad ( $n = 8$ ) con vacuna de ferritina MICA  
 15 y se reforzaron el día 12. Los ratones se expusieron a una inyección subcutánea de  $0.5 \times 10^6$  células B16F10 que expresan MICA el día 25 después de la vacunación inicial y el volumen del tumor se midió cada dos días. Se encontró que el crecimiento tumoral en el grupo inmunizado con ferritina MICA era significativamente más lento (cuadrado vacío) en comparación con el grupo control emparejado en edad no tratado, sin tratamiento previo (círculo lleno). En la figura 12B, los niveles  
 20 de sMICA fueron indetectables en sueros de ratones inmunizados con vacuna de ferritina MICA (triángulo vacío) mientras que se detectaron niveles altos de sMICA dentro de las dos semanas posteriores a la exposición tumoral en el suero del grupo control no inmunizado (triángulo relleno).

Las figuras 13A y 13B muestran que la reducción de las células T CD8 acelera el crecimiento tumoral en el modelo de melanoma subcutáneo B16F10 vacunado con ferritina MICA.  
 25 En la figura 13A, se inmunizaron ratones hembras C57BL/6 de 7 semanas de edad con vacuna ferritina MICA ( $n = 16$ ) o con vacuna control OVA ( $n = 8$ ) y se reforzaron el día 14. Los ratones se expusieron a una inyección subcutánea de  $0.5 \times 10^6$  células B16F10 que expresan MICA el día 21 después de la vacunación inicial. Los ratones recibieron una inyección intravenosa de 200  $\mu\text{g}$  de anticuerpo anti-CD8 ( $n = 8$ ) o anticuerpo de control isotipo ( $n = 8$ ) 2 días antes del desafío tumoral  
 30 y dos veces a la semana a una dosis de 100  $\mu\text{g}$  por ratón hasta el punto final del estudio. El volumen tumoral se midió cada dos días. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron  $\geq 250 \text{ mm}^2$ . Los tumores alcanzaron su volumen máximo el día 12 en ratones de control vacunados con proteína OVA tratados con anticuerpo CD8 (triángulo vacío) y en el día 14 en un grupo control que no ha recibido medicamento previo, sin tratamiento, sin disminución (círculo relleno). La disminución  
 35 de CD8 aceleró el crecimiento tumoral en el grupo vacunado con MICA (triángulo relleno) en

comparación con el grupo vacunado con MICA que recibió el anticuerpo de isotipo (cuadrado vacío). En la figura 13B, el análisis de supervivencia del experimento de disminución de CD8 demostró que el grupo de control que no ha recibido medicamento previo, sin tratamiento, sin disminución, de igual edad en la línea sólida gruesa, el grupo vacunado con proteína OVA en línea delgada

5 discontinua, vacunado con ferritina MICA, con CD8 disminuido en línea discontinua gruesa y los ratones vacunados con ferritina MICA, inyectados con anticuerpo de isotipo en línea sólida delgada.

Las figuras 14A y 14B muestran que las células NK contribuyen al efecto terapéutico de la vacuna de ferritina MICA en el modelo de melanoma subcutáneo B16F10. En la figura 14A, se inmunizaron ratones hembras C57BL/6 de 7 semanas de edad con vacuna de ferritina MICA (n = 16)  
 10 y se reforzaron el día 14. Los ratones se expusieron a una inyección subcutánea de  $0.5 \times 10^6$  células B16F10 que expresan MICA el día 21 después de la vacunación inicial. Los ratones recibieron una inyección intravenosa de 200 µg de anticuerpo anti-NK1.1 (n = 8) o anticuerpo de isotipo control (n = 8) 2 días antes del desafío tumoral y dos veces a la semana a una dosis de 100 µg por ratón hasta el punto final del estudio. El volumen tumoral se midió cada dos días. Los ratones se sacrificaron  
 15 cuando los tumores alcanzaron  $\geq 250 \text{ mm}^2$ . Los tumores alcanzaron su volumen máximo el día 14 en el grupo control que no ha recibido medicamento previo, sin tratamiento, sin disminución (círculo lleno). La disminución de células NK aceleró el crecimiento tumoral en el grupo vacunado con MICA (triángulo vacío) en comparación con el grupo vacunado con MICA que recibió el anticuerpo de isotipo (cuadrado lleno). En la figura 14B, el análisis de supervivencia del experimento de  
 20 disminución de células NK que muestra el grupo control que no ha recibido medicamento previo, sin tratamiento, sin disminución de edad idéntica en línea sólida gruesa; los ratones vacunados con ferritina MICA, con disminución de células NK en línea discontinua y vacunados con ferritina MICA, inyectados con anticuerpo de isotipo en línea sólida delgada.

Las figuras 15A y 15B muestran que los anticuerpos policlonales en suero generados  
 25 en respuesta a la vacuna de ferritina MICA previenen la metástasis pulmonar de células tumorales B16F10-MICA. En la figura 15A, se desafiaron ratones hembra Ighmtm1Cgn/J de 8 semanas de edad (n = 12) con una inyección intravenosa de  $0.5 \times 10^6$  MICA que expresan células de melanoma B16F10. Los ratones se asignaron al azar en 3 cohortes con 4 ratones cada uno. Los días 1, 2, 4 y 6 después de la exposición tumoral, a los ratones se les inyectó (vía intraperitoneal) 100 µl de suero  
 30 de punto final de ratones C57BL/6 inmunizados con OVA-proteína o ferritina MICA sin tratamiento previo. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la exposición al tumor; los pulmones se recogieron y se fijaron en formalina amortiguada neutra al 10% y se cuantificó el número de metástasis pulmonares. Los ratones a los que se les inyectó suero del grupo vacunado con ferritina MICA (cuadrado vacío) tuvieron significativamente menos metástasis pulmonares en comparación  
 35 con los ratones a los que se inyectó suero del grupo control no tratado, de igual edad (círculo lleno)

y grupo inmunizado con OVA-proteína. En la figura 15B, el nivel de sMICA fue menor en los ratones que recibieron sueros del grupo vacunado con ferritina MICA (cuadrado vacío) en comparación con los ratones que recibieron sueros del grupo inmunizado con OVA-proteína o sin tratamiento previo.

Las figuras 16A y 16B muestran que la vacuna de ferritina MICA también controla el crecimiento tumoral subcutáneo B16F10-MICB005. En la figura 16A, se inmunizaron ratones hembras C57BL/6 de 7 semanas ( $n = 4$ ) con vacuna de ferritina MICA y se reforzaron el día 14. Los ratones se expusieron a una inyección subcutánea de  $0.5 \times 10^6$  células B16F10 que expresan MICB el día 21 después de la vacunación inicial y el volumen del tumor se midió cada dos días. Se encontró que el crecimiento del tumor B16F10-MICB en el grupo inmunizado con ferritina MICA era significativamente más lento (cuadrado vacío) en comparación con el grupo de control inmunizado con OVA-proteína (círculo lleno). En la figura 16B, los niveles de sMICB eran casi indetectables en sueros de ratones inmunizados con vacuna de ferritina MICA (cuadrado vacío) mientras que se detectaron niveles altos de sMICB dentro de las dos semanas posteriores al desafío tumoral en el suero del grupo de control inmunizado con OVA-proteína (círculo lleno)

La figura 17 es una serie de gráficos que muestran la tinción de líneas celulares B16 que expresan MICA con sueros de ratones inmunizados con vacuna de ferritina MICA formulada con barras de sílice mesoporosas (línea discontinua) o conjugación directa de CpG a ferritina MICA (sin MSR (línea delgada y sólida). Estos datos ilustran que la vacunación con CpG directamente conjugado con el péptido de ferritina MICA induce una respuesta inmune más fuerte al dominio alfa 3 de MICA que la vacuna formulada con el andamio MSR. Para la vacuna MSR, 5 mg MSR + 200 ug proteína + 100 ug CpG + 1 ug GM-CSF, inmunizar el día 0; refuerzo el día 14; suero desde el día 28. Para la conjugación directa, 200 ug de proteína conjugada a ~5 ug de CpG (inmunización primaria); refuerzo (100 ug de proteína conjugada a ~5ug CpG + addavax (100 ul) + GM-CSF (1ug); inmunizar el día 0; refuerzo el día 21; suero a partir del día 28.

La figura 18A es una micrografía electrónica de  $\alpha 3$  de MICA - nanopartículas de ferritina purificadas.

La figura 18B es una imagen de SDS-PAGE de la proteína de la vacuna después de cromatografía de filtración en gel y afinidad.

La figura 19 es un gráfico que muestra que los anticuerpos policlonales inducidos por la vacuna del dominio  $\alpha 3$  de MICA inhiben el desprendimiento de MICA por las células tumorales humanas. El desprendimiento de MICA por la línea celular de melanoma A375 humano se cuantificó usando un ELISA tipo sándwich. La adición de pequeñas cantidades de sueros (1-10  $\mu$ l) de ratones vacunados con MICA  $\alpha 3$  - ferritina inhibió fuertemente el desprendimiento mientras que la adición de sueros de ratones control tuvo poco efecto.

Las figuras 20A a 20C son una serie de gráficos que muestran que la vacuna de

ferritina MICA induce respuestas de células T secundarias a neoantígenos. Examinamos si la vacuna del dominio  $\alpha 3$  de MICB induce respuestas secundarias a neoantígenos tumorales. Las células T de ganglio linfático se marcaron con CFSE y se cultivaron durante tres días con cuatro péptidos de neoantígeno diferentes identificados previamente para tumores B16F10 como epítomos de células T

5 CD4. Las respuestas de las células T CD4 se identificaron para tres de los cuatro péptidos basados en la tinción de IFN $\gamma$  intracelular en células proliferantes (CFSE<sup>bajo</sup>). Presumimos que los anticuerpos MICA desencadenan la absorción mediada por el receptor de Fc de los fragmentos tumorales apoptóticos por las células dendríticas y de ese modo promueven las respuestas de las células T a los neoantígenos. En las figuras 20A a 20B, se inmunizaron ratones B6 con  $\alpha 3$  de MICB - ferritina u

10 OVA (n = 5/grupo) y se les inyectaron células tumorales B16F10-MICB. Las células T se aislaron de los ganglios linfáticos que drenan el tumor 10 días después de la implantación del tumor y se marcaron con CFSE. Las células T se cultivaron durante 3 días con células de bazo CD11c+ en presencia de cuatro péptidos de neoantígeno de CD4 diferentes (10  $\mu$ g/ml) previamente identificados para tumores B16F10. Se realizó tinción con IFN $\gamma$  intracelular y se cuantificaron células T

15 proliferantes (CFSE-bajo) positivas para IFN $\gamma$  intracelular. Las respuestas de las células T a los péptidos de neoantígeno se compararon entre los ratones inmunizados con el antígeno control de OVA (figura 20A) o el dominio  $\alpha 3$  de MICB (figura 20B). Ambas poblaciones de células T se incubaron in vitro con el neoantígeno M30. En la figura 20C, se resumen las respuestas de células T a tres neoantígenos (M30, M44 y M48) para los que se observaron respuestas de células T

20 potenciadas en ratones inmunizados con MICB.

Las figuras 21A a 21B son gráficos que muestran que la inmunización con nanopartículas de ferritina MICA conjugadas con CpG induce anticuerpos de alto título. En la figura 21A, se conjugó MCA/B-ferritina de macaco con CpG ODN 1826 mediante química CLICK (kit de conjugación proteína-oligo, Solulink). Brevemente, el enlazador S-HyNic (succinimidil-6-hidrazino-

25 nicotinamida) se conjugó con la proteína a través de aminos primarios en la lisina y se añadió el enlazador S-4B (succinimidil-4-formilbenzamida) a CpG oligo. La proteína modificada y el oligo se incubaron en una reacción de conjugación catalizada. Después de esta reacción, se eliminó el exceso de CpG no conjugado mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El enlace proteína-oligo conjugado (estable, enlace bis-arilhidrazona) formado es trazable con UV a 350 nm (ver gráfico). En

30 la figura 21B, la proteína conjugada con CpG se usó para inmunizar ratones C57BL/6. Los anticuerpos específicos de MICA/B en el suero se analizaron el día 14 mediante el marcaje de las células B16-MICA. La proteína unida a CpG indujo anticuerpos de título más elevado (línea sólida delgada) en comparación con la proteína de ferritina MICA formulada con el andamio (línea discontinua, línea sólida gruesa que muestra los niveles de tinción de fondo).

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona una vacuna para el cáncer. Más específicamente, la presente invención proporciona una vacuna de dominio alfa 3 de MIC que puede provocar una  
5 respuesta inmune contra el dominio alfa 3 de MIC. Es importante destacar que la vacuna provoca anticuerpos contra el dominio  $\alpha 3$  de MIC, pero no contra los dominios  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  de MIC como para no interferir con la unión de los dominios  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  al receptor NKG2D en células NK.

El objetivo de la vacuna es inducir anticuerpos policlonales que se unen al dominio de Ig próximo a la membrana de MICA e inhiben el desprendimiento proteolítico de esta proteína de  
10 las células tumorales. El dominio alfa 3 de MICA se expresó en la superficie de nanopartículas. Específicamente, la secuencia de codificación del dominio alfa 3 de MICA se fusionó con la secuencia de ferritina (de *H. pylori*), dado que la ferritina forma espontáneamente nanopartículas. La vacuna se formuló con un andamio de inmunización (barras de sílice mesoporosas) usando CpG como el adyuvante y GM-CSF para reclutar células dendríticas en el sitio de inyección o conjugar  
15 directamente CpG a la proteína de fusión de ferritina de dominio alfa 3 de MICA y GM-CSF. Se encontró que las inyecciones de estas vacunas indujeron anticuerpos de título alto dirigidos contra el dominio alfa 3 de MICA. Sorprendentemente, la proteína de fusión de ferritina del dominio alfa 3 de MICA que tenía CpG directamente conjugado logró títulos de anticuerpos más elevados.

Estos anticuerpos inducidos por la composición de vacuna de la invención se unieron  
20 a múltiples alelos MICA y células tumorales teñidas que eran positivas para MICA. De manera importante, estos anticuerpos policlonales inhibieron el desprendimiento de MICA por las células tumorales. La eficacia in vivo de la vacuna se probó en un modelo de melanoma en ratón metastásico. Las células de melanoma B16F10 se modificaron genéticamente para expresar MICA y se inyectaron por vía intravenosa después de que los ratones se habían vacunado dos veces. La  
25 vacuna proporcionó un alto nivel de protección, mientras que los ratones de control tuvieron un gran número de metástasis pulmonares (~150-200).

La vacuna de la invención es conceptualmente diferente de las vacunas convencionales contra el cáncer que intentan inducir una respuesta inmune que elimina todas las células cancerosas que expresan un antígeno particular. Por el contrario, el objetivo de la vacuna de  
30 la invención es evitar el escape del tumor de una vía de vigilancia inmunitaria importante. Esta vacuna será segura en base al estudio de pacientes con anticuerpos MICA y al hecho de que la expresión MIC señala las células para su eliminación por linfocitos citotóxicos. Los beneficios del enfoque de la vacuna son: bajo costo de una vacuna, protección a largo plazo contra la vigilancia inmune, inducción de anticuerpos policlonales que inhiben el desprendimiento y liberación rápida del  
35 MIC por formación de complejos inmunes e inducción de una respuesta de células T contra otros

antígenos tumorales por captación mejorada de fragmentos tumorales apoptóticos por células dendríticas.

También se proporcionan mediante la invención nanopartículas autoensambladas basadas en ferritina que muestran porciones inmunogénicas del dominio alfa 3 de MICA en su superficie. Opcionalmente, las nanopartículas incluyen además un oligonucleótido CpG. Por ejemplo, el oligonucleótido CpG se acopla covalentemente a la proteína de fusión de ferritina del dominio alfa 3 de MICA. Tales nanopartículas son útiles para vacunar a las personas. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a proteínas de fusión para producir tales nanopartículas y moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas. Adicionalmente, la presente invención se refiere a métodos para producir nanopartículas de la presente invención y a métodos para usar tales nanopartículas para vacunar individuos.

También se proporcionan mediante la invención composiciones de vacuna que comprenden un péptido de dominio alfa 3 de MIC unido a un oligonucleótido CpG.

#### 15 **Vacunas contra la proteína de dominio alfa 3 de MIC**

La invención proporciona una composición de vacuna adecuada para la administración a un ser humano que comprende, como componente inmunogénico, al menos un péptido de dominio alfa 3 de MIC. El péptido de dominio alfa 3 de MIC comprende o consiste en el dominio alfa 3 de longitud completa de MICA o MICB, cuyo dominio corresponde a los aminoácidos 181 a 274 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, el péptido incluye uno o más aminoácidos flanqueantes. En este contexto, el término "aminoácidos flanqueantes" se refiere a los aminoácidos adyacentes a la secuencia del dominio alfa 3 de MIC en la secuencia de referencia de longitud completa [SEQ ID NO: 1 para MICA o SEQ ID NOs: 2 para MICB]. En ciertas modalidades, el péptido comprende 2, 4, 6, 8 o 10 aminoácidos flanqueantes en su extremo N- o C-terminal, o ambos. En algunas modalidades, el péptido de vacuna no está glicosilado.

| Secuencia de aminoácidos de MICA |
|----------------------------------|
|----------------------------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HSLRYNLTVLSWDGSGVQSGFLAEVHLDGQPFLRYDRQKCRAP<br>QGQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGL<br>HSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGELFLSQNVETEEWTPQS<br>SRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLES<br>SVVLRRTVPPMVNVRSEASEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQD<br>GVSLSHDTQQWGDVLPDGNQTYQTWVATRICQGEQRFYCME<br>HSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFHVSAAAAAAIFVIIIFVY<br>RCCKKKTSAAEGPELVSLQVLDQHPVGTSDHRDATQLGFQPLMS<br>ALGSTGSTEGA (SEQ ID NO:1) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                  |
|----------------------------------|
| Secuencia de aminoácidos de MICB |
|----------------------------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PHSLRYNLMVLSQDGSVQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRRA<br>KPQGQWAEDVLGAKTWDTEDELTENGQDLRRTLTHIKDQKG<br>GLHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYDGEFLSQNLETQESTVP<br>QSSRAQTLAMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRY<br>LKSGVAIRRTVPPMVNVTCSSEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTW<br>RQDGVSLSHNTQQWGDVLPDGGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCY<br>MEHSGNHGTHPVPSPGKALVLQSQRDTDFPYVSAAMPCFVIIILCVP<br>CCKKKTSAAGPELVSLQVLDQHPVGTGDHRDAAQLGFQPLMSA<br>TGSTGSTEGA (SEQ ID NO: 2) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

- En una modalidad preferida, la vacuna comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de:
- 5 RTVPPMVNVTREASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDNGTYQTWVATRIS QGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFH (SEQ ID NO: 3) o RTVPPMVQVTRSEASEGQITVTCRASGFYPWNINLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDNGTYQTWVATRIS QGEEQRFTCYMEHSGQHSSTHPVPSGKVLVLQSHWQTFH (SEQ ID NO:4) .

- En otra modalidad, la composición de vacuna comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia del dominio alfa 3 de MIC. El ácido nucleico puede estar en forma de un vector de expresión, por ejemplo un plásmido o un vector viral, o el ácido nucleico puede empaquetarse en nanopartículas. En una modalidad, el ácido nucleico se administra a un sujeto mediante inyección. En una modalidad, el ácido nucleico se inyecta como ADN purificado o en forma de nanopartículas. En una modalidad, se inyectan células inmunes modificadas que se han modificado para expresar el
- 15 ácido nucleico. En una modalidad, las células inmunes se modifican por transfección o infección in vitro con un vector que comprende el ácido nucleico.

- Los péptidos que se forman o se incorporan en las composiciones de vacuna de la invención preferiblemente se purifican a partir de precursores químicos contaminantes, si se sintetizan químicamente, o sustancialmente libres de material celular de la fuente de células o tejidos
- 20 de la que se derivan. En una modalidad específica, los péptidos son 60%, preferiblemente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% libres de precursores químicos contaminantes, proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. En una modalidad preferida, los péptidos están sustancialmente libres de virus contaminante. Preferiblemente, cada composición para administrar a un sujeto es al menos 95%, al menos 97%, o al menos 99% libre de virus contaminante.

- En una modalidad, el péptido de dominio alfa 3 de MIC de una composición de vacuna de la invención comprende o consiste en uno o más péptidos que es al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% idéntico a un péptido que incluye los aminoácidos 181 a 274 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En este contexto, el término "similar" se refiere a la similitud de secuencia de aminoácidos que se define según el número de cambios de aminoácidos

conservativos y no conservativos en una secuencia de consulta con respecto a una secuencia de referencia. En la técnica se conocen cambios de aminoácidos conservativos y no conservativos. Véase, por ejemplo, W. R. Taylor, *The Classification of Amino Acid Conservation*, J. Theor. Biol. 1986 119:205-218, y D. Bordo and P. Argos, *Suggestions for "Safe" Residue Substitutions in Site-Directed*  
 5 *Mutagenesis*, 1991 J. Mol. Biol. 217:721-729. Generalmente, un cambio conservativo de aminoácidos se refiere a una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades químicas sustancialmente similares, específicamente con referencia a las cadenas laterales de aminoácidos. Un cambio no conservativo se refiere a una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades químicas sustancialmente diferentes. Generalmente, las sustituciones conservativas son  
 10 aquellas reconocidas en la técnica que es poco probable que afecten a la estructura global o a la función biológica del polipéptido, mientras que los cambios no conservativos se reconocen como más propensos a afectar la estructura y la función.

Los ejemplos no limitantes de un cambio conservativo de aminoácidos incluyen la sustitución de aminoácidos dentro de los siguientes grupos: alifático, aromático, polar, no polar,  
 15 ácido, básico, hidrofóbico fosforilable, hidrófilo, no polar pequeño, polar pequeño, no polar grande y polar grande. Los ejemplos no limitantes de cambios de aminoácidos no conservativos incluyen sustituciones de aminoácidos entre los grupos anteriores.

En una modalidad, un cambio de aminoácido conservativo es una sustitución en la que la matriz de sustitución para el par de residuos tiene un valor positivo. Los ejemplos de matrices  
 20 de sustitución de aminoácidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, la matriz BLOSUM50 o la matriz PAM250 (ver W. A. Pearson, *Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA*, Meth. Enzymology, 1990 183:63-98, ed. R. Doolittle, Academic Press, San Diego). Para obtener más ejemplos de matrices de puntuación y una comparación entre ellas, ver M. S. Johnson and J. P. Overington, 1993, *A Structural Basis for Sequence Comparisons: An Evaluation of Scoring*  
 25 *Methodologies*, J. Mol. Biol. 233:716-738.

En una modalidad preferida, un cambio de aminoácido conservativo es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido dentro del mismo grupo químico en donde los grupos se seleccionan de aminoácidos neutros y polares (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly, Asn, Gln), aminoácidos cargados negativamente y polares (Asp, Glu), aminoácidos cargados positivamente y  
 30 polares (His, Arg, Lys), aminoácidos no polares que carecen de una estructura de anillo (Met, Ile, Leu, Val), aminoácidos no polares que tienen una estructura de anillo (Phe, Tyr, Trp) y cisteína.

En diversas modalidades, el péptido se conjuga con una secuencia de oligonucleótido CpG.

En otras modalidades, el péptido se conjuga con una proteína portadora. El término  
 35 "proteína portadora" está destinado a cubrir a péptidos pequeños y polipéptidos grandes (>10 kDa).

La proteína portadora puede ser cualquier péptido o proteína. Puede comprender uno o más epítopos auxiliares-T. La proteína portadora puede ser toxoide tetánico (TT), fragmento toxoide tetánico C, mutantes no tóxicos de la toxina tetánica [observar que todas estas variantes de TT se consideran el mismo tipo de proteína portadora para los fines de esta invención], polipéptidos que comprenden epítopos de células-T de toxina tetánica, como N19 (WO2006/067632), toxoide diftérico (DT), CRM197, otros mutantes no tóxicos de la toxina diftérica como CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838 - 3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas por Nicholls and Youle en *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; supresión o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones descritas en la patente de Estados Unidos Nos. 4,709,017 o 4,950,740; la mutación de al menos uno o más residuos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones descritas en la patente de Estados Unidos Nos. 5,917,017 o 6,455,673; o fragmento descrito en la patente de Estados Unidos No. 5,843,711] (obsérvese que todas estas variantes de DT se consideran el mismo tipo de proteína portadora para los fines de esta invención), neumolisina neumocócica (Kuo et al (1995) *Infect Immun* 63; 2706-13), OMPC (proteína de membrana externa meningocócica - normalmente extraída del serogrupo N. meningitidis B-EP0372501), péptidos sintéticos (EP0378881, EP0427347), proteínas de choque térmico (WO 93/17712, WO 94/03208), proteínas de pertussis (WO 98/58668, EP0471177), citoquinas, linfoquinas, factores de crecimiento u hormonas (WO 91/01146), proteínas artificiales que comprenden múltiples epítopos de células T CD4+ humanas de diversos antígenos derivados de patógenos (Falugi et al (2001) *Eur J Immunol* 31; 3816-3824) tales como proteína N19 (Baraldoi et al (2004) *Infect Immun* 72; 4884-7) proteína de superficie neumocócica PspA (WO 02/091998), proteínas de captación de hierro (WO 01/72337), toxina A o B de *C. difficile* (WO 00/61761), Proteína D de *H. influenzae* (EP594610 y WO 00/56360), PhtA neumocócica (WO 98/18930, también referida a Sp36), PhtD neumocócica (descrito en WO 00/37105, y también se refiere a Sp036D), PhtB neumocócica (descrito en WO 00/37105, y también se refiere a Sp036B), o PhtE (descrito en WO00/30299 y se conoce como BVH-3).

En una modalidad, la proteína portadora puede seleccionarse del grupo que consiste en: toxoide tetánico (TT), fragmento C de toxoide tetánico, toxoide diftérico (DT), CRM197, neumolisina (Ply), proteína D, PhtD, PhtDE y N19. En una modalidad, la proteína portadora es CRM197.

### **Vacunas que comprenden proteínas de fusión de HA-ferritina**

Los inventores también han descubierto que la fusión de un péptido de dominio alfa 3 de MIC con proteína de ferritina una proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC) da como resultado una vacuna que provoca una respuesta inmune robusta al cáncer. Dichas proteínas de

fusión de ferritina MIC alfa 3 se autoensamblan en nanopartículas que muestran porciones inmunogénicas del péptido de dominio alfa 3 de MIC en su superficie. Estas nanopartículas son útiles para vacunar a las personas contra el dominio alfa 3 de MIC. Por lo tanto, una modalidad de la presente invención es una proteína de fusión de ferritina MIC alfa-3 que comprende una subunidad  
 5 de ferritina monomérica descrita en este documento unida a un péptido del dominio alfa 3 de MIC descrito en la presente. La proteína de fusión de ferritina MIC alfa 3 es capaz de autoensamblarse en nanopartículas. En diversos aspectos, la proteína de fusión comprende además una secuencia de oligonucleótidos CpG. La secuencia de oligonucleótidos CpG puede unirse covalentemente a la proteína de fusión de ferritina MIC alfa 3.

10 La ferritina es una proteína globular que se encuentra en todos los animales, bacterias y plantas, que actúa principalmente para controlar la velocidad y la ubicación de la formación polinuclear de  $\text{Fe(III)}_2\text{O}_3$  mediante el transporte de iones de hierro hidratados y protones hacia y desde un núcleo mineralizado. La forma globular de la ferritina está compuesta de proteínas de subunidades monoméricas (también denominadas subunidades de ferritina monoméricas), que  
 15 son polipéptidos que tienen un peso molecular de aproximadamente 17-20 kDa. Cada subunidad de ferritina monomérica tiene la topología de un haz de hélice que incluye un motivo de hélice antiparalelo cuatro, con una quinta hélice más corta (la hélice c-terminal) que se encuentra aproximadamente perpendicular al eje largo del haz de hélice 4. De acuerdo con la convención, las hélices están etiquetadas como `A, B, C y D & E` del N-terminal, respectivamente. La secuencia N-  
 20 terminal se encuentra adyacente a la cápside en tres ejes y se extiende a la superficie, mientras que las hélices E se juntan en el eje cuádruple con el C-terminal extendiéndose en el núcleo de la partícula. La consecuencia de este empaque crea dos poros en la superficie de la cápside. Se espera que uno o ambos de estos poros representen el punto por el cual el hierro hidratado se difunde dentro y fuera de la cápside. Después de la producción, estas proteínas de subunidades de ferritina  
 25 monoméricas se autoensamblan en la proteína de ferritina globular. Por lo tanto, la forma globular de la ferritina comprende 24 proteínas de subunidades de ferritina monoméricas, y tiene una estructura de tipo cápside que tiene 432 de simetría.

Según la presente invención, una subunidad de ferritina monomérica de la presente invención es un polipéptido único de longitud completa de una proteína de ferritina, o cualquier  
 30 porción de la misma, que es capaz de dirigir el autoensamble de subunidades de ferritina monoméricas en la forma globular de la proteína. Las secuencias de aminoácidos de las subunidades de ferritina monoméricas de cualquier proteína de ferritina conocida pueden usarse para producir proteínas de fusión de la presente invención, siempre que la subunidad de ferritina monomérica sea capaz de autoensamblarse en una nanopartícula que presente el dominio alfa 3 de MIC en su  
 35 superficie. En una modalidad, la subunidad monomérica es de una proteína de ferritina seleccionada

del grupo que consiste en una proteína de ferritina bacteriana, una proteína de ferritina de planta, una proteína de ferritina de alga, una proteína de ferritina de insecto, una proteína de ferritina fúngica y una proteína de ferritina de mamífero. En una modalidad, la proteína de ferritina es de *Helicobacter pylori*.

5 Las proteínas de fusión de ferritina alfa 3 de MIC de la presente invención no necesitan comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido de subunidad monomérica de una proteína de ferritina. Se pueden utilizar porciones, o regiones, de la proteína de la subunidad de ferritina monomérica siempre que la porción comprenda una secuencia de aminoácidos que dirija el autoensamble de las subunidades de ferritina monoméricas en la forma  
10 globular de la proteína. Un ejemplo de dicha región se localiza entre los aminoácidos 5 y 167 de la proteína de ferritina de *Helicobacter pylori*. Se describen regiones más específicas en Zhang, Y. Self-Assembly in the Ferritin Nano-Cage Protein Super Family. 2011, Int. J. Mol. Sci., 12, 5406-5421, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Una modalidad de la presente invención es una proteína de fusión de ferritina alfa 3  
15 de MIC que comprende una proteína del dominio alfa 3 de MIC de la presente invención unida a al menos 25 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 75 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos, o al menos 150 aminoácidos contiguos de una subunidad de ferritina monomérica, en donde la proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC es capaz de autoensamblarse en nanopartículas. Una modalidad de la presente invención es una  
20 proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC que comprende una proteína de dominio alfa 3 de MIC de la presente invención unida a al menos 25 aminoácidos contiguos, al menos 50 aminoácidos contiguos, al menos 75 aminoácidos contiguos, al menos 100 aminoácidos contiguos, o al menos 150 aminoácidos contiguos de la región de una proteína de ferritina correspondiente a las secuencias de aminoácidos de la subunidad monomérica de ferritina de *Helicobacter pylori* que dirigen el  
25 autoensamblaje de las subunidades monoméricas en la forma globular de la proteína de ferritina, en donde la proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC es capaz de autoensamblarse en nanopartículas.

Es bien conocido en la técnica que se pueden hacer algunas variaciones en la secuencia de aminoácidos de una proteína sin afectar la actividad de la proteína. Tales variaciones  
30 incluyen la inserción de residuos de aminoácidos, supresiones de residuos de aminoácidos y sustituciones de residuos de aminoácidos. Así, en una modalidad, la secuencia de la subunidad de ferritina monomérica es suficientemente divergente de la secuencia de una subunidad de ferritina encontrada naturalmente en un mamífero, de modo que cuando la subunidad de ferritina monomérica variante se introduce en el mamífero, no da como resultado la producción de  
35 anticuerpos que reaccionan con la proteína de ferritina natural del mamífero. De acuerdo con la

presente invención, dicha subunidad monomérica se denomina inmunogenéticamente neutra. Una modalidad de la presente invención es una proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC que comprende una proteína del dominio alfa 3 de MIC de la presente invención unida a una secuencia de aminoácidos al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, y al menos 97% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una subunidad de ferritina monomérica que es responsable de dirigir el autoensamble de las subunidades de ferritina monoméricas en la forma globular de la proteína, donde la proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC es capaz de autoensamblarse en nanopartículas. En una modalidad, la proteína de fusión de ferritina HA comprende una secuencia polipeptídica idéntica en secuencia a una subunidad monomérica de ferritina. Una modalidad de la presente invención es una proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC que comprende una proteína del dominio alfa 3 de MIC de la presente invención unida a una secuencia de aminoácidos al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, y al menos 97% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una subunidad de ferritina monomérica de *Helicobacter pylori*, en donde la proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC es capaz de autoensamblarse en nanopartículas.

En algunas modalidades, puede ser útil manipular mutaciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la presente invención. Por ejemplo, puede ser útil alterar sitios tales como sitios de reconocimiento enzimático o sitios de glucosilación en la subunidad monomérica de ferritina, el dominio de trimerización o las secuencias enlazadoras, a fin de proporcionar a la proteína de fusión propiedades beneficiosas (por ejemplo, solubilidad, vida media, enmascarar porciones de la proteína de la vigilancia inmune). A este respecto, se sabe que la subunidad monomérica de la ferritina no está glicosilada de forma natural. Sin embargo, puede glicosilarse si se expresa como una proteína secretada en células de mamífero o de levadura. Por lo tanto, en una modalidad, los sitios potenciales de glucosilación N-enlazado en las secuencias de aminoácidos de la subunidad de ferritina monomérica están mutados de modo que las secuencias de la subunidad de ferritina mutada ya no están glicosiladas en el sitio mutado.

Las proteínas de la presente invención están codificadas por moléculas de ácido nucleico de la presente invención. Además, se expresan mediante construcciones de ácido nucleico de la presente invención. Como se usa en el presente documento, una construcción de ácido nucleico es un vector de expresión recombinante, es decir, un vector unido a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de manera que la molécula de ácido nucleico puede afectar la expresión de la proteína cuando la construcción de ácido nucleico se administra, por ejemplo, un sujeto o un órgano, tejido o célula. El vector también permite el transporte de la molécula de ácido nucleico a una célula dentro de un entorno, tal como, pero no limitado a, un organismo, tejido o cultivo celular. Una construcción de ácido nucleico de la presente descripción se produce por

intervención humana. La construcción de ácido nucleico puede ser ADN, ARN o variantes de los mismos. El vector puede ser un plásmido de ADN, un vector viral u otro vector. En una modalidad, un vector puede ser un citomegalovirus (CMV), retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus de herpes, virus vaccinia, poliovirus, virus sindbis o cualquier otro vector de virus de ADN o ARN. En una modalidad, un vector puede ser un vector lentiviral pseudotipado o retroviral. En una modalidad, un vector puede ser un plásmido de ADN. En una modalidad, un vector puede ser un plásmido de ADN que comprende componentes virales y componentes de plásmido para permitir la liberación y expresión de moléculas de ácido nucleico. Los métodos para la construcción de construcciones de ácido nucleico de la presente descripción son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> edición, Sambrook et al. 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press y Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1994. En una modalidad, el vector es un plásmido de ADN, tal como un plásmido CMV/R tal como CMV/R o CMV/R8 KB (también referido aquí como CMV/R8 kb). Ejemplos de CMV/R y CMV/R 8 kb se proporcionan en este documento. CMV/R también se describe en la patente de Estados Unidos No. 7,094,598 B2, emitida el 22 de agosto de 2006.

Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el inmunógeno de péptido del dominio alfa 3 de MIC, una subunidad monomérica de ferritina y/o una proteína de fusión de ferritina de alfa 3 de MIC de la presente invención. Una molécula de ácido nucleico puede producirse de forma recombinante, sintética o mediante una combinación de procedimientos recombinantes y sintéticos. Una molécula de ácido nucleico de la descripción puede tener una secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje o una secuencia de ácido nucleico de codón modificado para, por ejemplo, incorporar codones mejor reconocidos por el sistema de traducción humano. En una modalidad, una molécula de ácido nucleico puede ser de ingeniería genética para introducir, o eliminar, los codones que codifican diferentes aminoácidos, tales como para introducir codones que codifican un sitio de glicosilación N-enlazado. Los métodos para producir moléculas de ácido nucleico de la descripción son conocidos en la técnica, particularmente una vez que se conoce la secuencia de ácido nucleico. Debe apreciarse que una construcción de ácido nucleico puede comprender una molécula de ácido nucleico o más de una molécula de ácido nucleico. También debe apreciarse que una molécula de ácido nucleico puede codificar una proteína o más de una proteína.

En una modalidad, la subunidad monomérica de ferritina proviene de la proteína de ferritina de *Helicobacter pylori*.

También se incorporan en la presente invención secuencias de ácido nucleico que son variantes de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la presente invención. Tales variantes incluyen inserciones de nucleótidos, supresiones y sustituciones, siempre que no

afecten a la capacidad de las proteínas de fusión de la presente invención se autoensamblan en nanopartículas, o significativamente afectar a la capacidad de la porción del dominio alfa 3 de MIC de las proteínas de fusión para provocar una respuesta inmune a la proteína del dominio alfa 3 de MIC.

5 También están abarcados por la presente invención los sistemas de expresión para producir proteínas de fusión de la presente invención. En una modalidad, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención están operativamente unidas a un promotor. Como se usa en el presente documento, operativamente enlazado significa que las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico enlazadas se pueden expresar cuando se activa el promotor unido. Los  
10 promotores útiles para poner en práctica la presente invención son conocidos por los expertos en la técnica. Una modalidad de la presente invención es una célula recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Una modalidad de la presente invención es un virus recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención.

Como se indicó anteriormente, la producción recombinante de las proteínas de  
15 fusión de ferritina de la presente invención puede tener lugar usando cualquier tecnología recombinante convencional adecuada actualmente conocida en el campo. Por ejemplo, la clonación molecular de una proteína de fusión, tales como ferritina con una proteína adecuada, tal como la proteína del dominio alfa 3 de MIC recombinante, puede llevarse a cabo a través de la expresión en E. coli con la proteína de la subunidad monomérica adecuada, tal como la subunidad monomérica de  
20 ferritina helicobacter pylori . La construcción puede transformarse a continuación en células de expresión de proteínas, crecer hasta un tamaño adecuado e inducirse para producir la proteína de fusión.

Como se ha descrito, debido a que las proteínas de fusión de ferritina alfa 3 de MIC de la presente invención comprenden una subunidad monomérica de ferritina, pueden  
25 autoensamblarse. De acuerdo con la presente invención, la supramolécula resultante de dicho autoensamble se denomina como una nanopartícula basada en ferritina que expresa alfa 3 de MIC. Para facilitar la discusión, la nanopartícula basada en ferritina que expresa alfa 3 de MIC se denominará simplemente como una, o la, nanopartícula (np). Las nanopartículas de la presente invención tienen las mismas características estructurales que las proteínas de ferritina descritas  
30 anteriormente. Es decir, contienen 24 subunidades y tienen 432 de simetría. En el caso de nanopartículas de la presente invención, las subunidades son las proteínas de fusión que comprenden una subunidad monomérica de ferritina unida a una proteína del dominio alfa 3 de MIC. Tales nanopartículas muestran al menos una porción de la proteína del dominio alfa 3 de MIC en su superficie. Por lo tanto, una modalidad de la presente invención es una nanopartícula que  
35 comprende una proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC, en donde la proteína de fusión

comprende una subunidad monomérica de ferritina unida a una proteína del dominio alfa 3 de MIC. En una modalidad, la nanopartícula es un octaedro.

Debido a que las proteínas de fusión y las nanopartículas de ferritina alfa 3 de MIC de la presente invención pueden provocar una respuesta inmune a una proteína del dominio alfa 3 de MIC, pueden usarse como vacunas para tratar el cáncer. De acuerdo con la presente invención, una vacuna puede ser un inmunógeno de péptido del dominio alfa 3 de MIC, una proteína de fusión de ferritina alfa 3 de MIC, o una nanopartícula de la presente invención. Las vacunas de la presente invención también pueden contener otros componentes tales como adyuvantes, reguladores de pH y similares. Aunque puede usarse cualquier adyuvante, las modalidades preferidas pueden contener:

10 adyuvantes químicos tales como fosfato de aluminio, cloruro de benzalconio, ubenimex y QS21; adyuvantes genéticos tales como el gen IL-2 o fragmentos del mismo, el gen del factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) o fragmentos del mismo, el gen IL-18 o fragmentos del mismo, el gen del ligando 21 (CCL21) de quimioquina (motivo C--C) o fragmentos del mismo, el gen de IL-6 o fragmentos del mismo, CpG, LPS, agonistas de TLR y otros genes

15 inmunoestimuladores; adyuvantes proteicos tales como IL-2 o fragmentos de los mismos, el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) o fragmentos del mismo, IL-18 o fragmentos del mismo, el ligando 21 de quimioquina (motivo C--C) o fragmentos de los mismos, IL-6 o fragmentos de los mismos, CpG, LPS, agonistas de TLR y otras citoquinas inmunoestimuladoras o fragmentos de las mismas; adyuvantes lipídicos tales como liposomas catiónicos, N3 (lípid

20 catiónico), monofosforil lípido A (MPL1); otros adyuvantes, incluyendo toxina del cólera, enterotoxina, ligando de tirosina quinasa 3 similar a Fms (Flt-3L), bupivacaína, marcaína y levamisol.

### **Sílice mesoporosa**

La composición de vacuna de acuerdo con la invención puede comprender además

25 un andamio de inmunización. En una modalidad, el andamio de inmunización es nanopartículas de sílice mesoporosas (MSR). Las MSR pueden tener cualquier configuración o forma, como barras, esferas, cables, cubos o poliedros. La configuración o forma de MSR es típicamente el resultado de condiciones de reacción específicas. Por ejemplo, las nanopartículas de sílice mesoporosas se pueden sintetizar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como hacer reaccionar ortosilicato

30 de tetraetilo con una plantilla hecha de barras micelares. El resultado es una colección de esferas o barras de tamaño nanométrico que se llenan con una disposición regular de poros. La plantilla se puede eliminar lavando con un solvente ajustado al pH apropiado. En otra técnica, la partícula mesoporosa podría sintetizarse usando un método simple de sol-gel o un método de secado por pulverización. El ortosilicato de tetraetilo también se usa con un monómero de polímero adicional

(como plantilla). Otros métodos incluyen los descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 20150072009, 20120264599 y 20120256336, incorporados aquí como referencia.

### **Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF)**

5 El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es una proteína secretada por macrófagos, células T, mastocitos, células endoteliales y fibroblastos. Específicamente, GM-CSF es una citoquina que funciona como un factor de crecimiento de glóbulos blancos. GM-CSF estimula las células madre para producir granulocitos y monocitos. Los monocitos salen del torrente sanguíneo, migran al tejido y posteriormente maduran en macrófagos.

10 Los dispositivos de andamio descritos en este documento comprenden y liberan polipéptidos GM-CSF para atraer DC hospederas al dispositivo. Los polipéptidos GM-CSF contemplados se aíslan de fuentes endógenas o se sintetizan in vivo o in vitro. Los polipéptidos GM-CSF endógenos se aíslan del tejido humano sano. Los polipéptidos GM-CSF sintéticos se sintetizan in vivo después de la transfección o transformación del ADN de molde en un organismo o célula  
15 hospedero, por ejemplo un mamífero o línea celular humana cultivada. Alternativamente, los polipéptidos GM-CSF sintéticos se sintetizan in vitro mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos reconocidos en la técnica (por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989), incorporado aquí como referencia).

20 Los polipéptidos GM-CSF se modifican para aumentar la estabilidad de la proteína in vivo. Alternativamente, los polipéptidos GM-CSF están diseñados para ser más o menos inmunogénicos. Los polipéptidos GM-CSF humanos maduros endógenos están glicosilados, según se informa, en los residuos de aminoácidos 23 (leucina), 27 (asparagina) y 39 (ácido glutámico) (véase la patente de Estados Unidos No. 5,073,627). Los polipéptidos de GM-CSF de la presente invención  
25 se modifican en uno o más de estos residuos de aminoácidos con respecto al estado de glicosilación.

Los polipéptidos GM-CSF son recombinantes. Alternativamente, los polipéptidos GM-CSF son derivados humanizados de polipéptidos GM-CSF de mamíferos. Las especies de mamíferos ejemplares de las que se derivan los polipéptidos GM-CSF incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, hámster, cobaya, hurón, gato, perro, mono o primate. En una modalidad preferida, GM-CSF es una  
30 proteína humana recombinante (PeproTech, Catálogo #300-03). Alternativamente, GM-CSF es una proteína recombinante murina (de ratón) (PeproTech, Catálogo #315-03). Finalmente, GM-CSF es un derivado humanizado de una proteína de ratón recombinante.

El GM-CSF recombinante humano (PeproTech, Catálogo #300-03) está codificado por la siguiente secuencia polipeptídica:

MAPARSPSPS TQPWEHVNAI QEARRLLNLS RDTAAEMNET VEVIEMFDL QEPTCLQTRL  
 ELYKQGLRGS LTKLKGPLTM MASHYKQHCP PTPETSCATQ IITFESFKEN LKDFLLVIPF DCWEPVQE  
 (SEQ ID NO: 26)

El GM-CSF recombinante murino (PeproTech, Catálogo #315-03) está codificado por  
 5 la siguiente secuencia polipeptídica:

MAPTRSPITV TRPWKHVEAI KEALNLLDDM PVTLNEEVEV VSNEFSFKKL TCVQTRLKIF  
 EQGLRGNF TK LKGALNMTAS YYQTYCPPTP ETDCE TQVTT YADFIDSLKT FLTDIPFECK KPVQK  
 (SEQ ID NO: 27)

El GM-CSF endógeno humano está codificado por la siguiente secuencia de ARNm

10 (NCBI Número de acceso NM 000758 y SEQ ID NO: 28):  
 acacagagag aaaggctaaa gttctctgga ggatgtggct gcagagcctg ctgctcttgg 61  
 gcaactgtggc ctgcagcatc tctgcacccg cccgctcgcc cagccccagc acgcagccct 121  
 gggagcatgt gaatgccatc caggaggccc ggcgtctcct gaacctgagt agagacactg 181  
 ctgctgagat gaatgaaaca gtagaagtca tctcagaaat gtttgacctc caggagccga 241  
 15 cctgcctaca gaccgcctg gagctgtaca agcagggcct gcggggcagc ctcaccaagc 301  
 tcaagggccc cttgaccatg atggccagcc actacaagca gcaactgccct ccaaccccg 361  
 aaacttctctg tgcaaccagc attatcacct ttgaaagttt caaagagaac ctgaaggact 421  
 ttctgcttgt catccctttt gactgctggg agccagtcca ggagttagac cggccagatg 481  
 aggctggcca agccggggag ctgctctctc atgaaacaag agctagaaac tcaggatgg 541  
 20 catcttgagag ggaccaaggg gtggggcaca gccatggtgg gaggggcctg gacctgccct 601  
 gggccacact gacctgata caggcatggc agaagaatgg gaatatatta tactgacaga 661  
 aatcagtaat atttatatat ttatatattt aaaatatatta tttatttatt tatttaagtt 721  
 catattccat atttattcaa gatgttttac cgtaataatt attattaaaa atatgcttct 781 a  
 (SEQ ID NO: 28)

25 El GM-CSF endógeno humano está codificado por la siguiente secuencia de  
 aminoácidos (No. de acceso NCBI NP000749.2 y SEQ ID NO: 29):

MWLQSLLLLGTVACSIAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDT  
 AAEMNETVEVIEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMM  
 ASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE (SEQ ID NO: 29)

30

### Secuencias de oligonucleótidos de citosina-guanosina (CpG) (CpG-ODN)

Los sitios CpG son regiones de ácido desoxirribonucleico (ADN) donde se produce  
 un nucleótido de cisteína junto a un nucleótido de guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo  
 de su longitud (la "p" representa el enlace de fosfato entre ellos y los distingue de un  
 35 emparejamiento de la base complementaria de citosina-guanina). Los sitios CpG desempeñan un  
 papel fundamental en la metilación del ADN, que es uno de los diversos mecanismos endógenos que  
 las células usan para silenciar la expresión génica. La metilación de los sitios CpG dentro de los

elementos del promotor puede conducir al silenciamiento génico. En el caso del cáncer, se sabe que los genes supresores de tumores a menudo se silencian mientras que se expresan oncogenes o genes inductores de cáncer. Se ha demostrado que los sitios CpG en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores (que previenen la formación de cáncer) están metilados, mientras que los sitios CpG en las regiones promotoras de los oncogenes están hipometilados o no metilados en ciertos cánceres. El receptor TLR-9 se une a los sitios CpG no metilados en el ADN.

La composición de vacuna descrita en este documento comprende oligonucleótidos CpG. Los oligonucleótidos CpG se aíslan de fuentes endógenas o se sintetizan in vivo o in vitro. Las fuentes ejemplares de oligonucleótidos CpG endógenos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, bacterias, hongos, protozoos, virus, mohos o parásitos. Alternativamente, se aíslan oligonucleótidos CpG endógenos de tumores neoplásicos benignos o malignos de mamíferos. Los oligonucleótidos CpG sintéticos se sintetizan in vivo después de la transfección o transformación del ADN de molde en un organismo hospedero. Alternativamente, los oligonucleótidos sintéticos CpG se sintetizan in vitro mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos reconocidos en la técnica (Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989), incorporado aquí como referencia).

Los oligonucleótidos CpG se presentan para la captación celular por células dendríticas. Por ejemplo, se usan oligonucleótidos CpG desnudos. El término "desnudo" se usa para describir un polinucleótido (u oligonucleótido) endógeno o sintético aislado que está libre de sustituyentes adicionales. En otra modalidad, los oligonucleótidos CpG están unidos a uno o más compuestos para aumentar la eficacia de la captación celular. Alternativamente, o además, los oligonucleótidos CpG están unidos a uno o más compuestos para aumentar la estabilidad del oligonucleótido dentro del andamio y/o célula dendrítica. Los oligonucleótidos CpG se condensan opcionalmente antes de la captación celular. Por ejemplo, los oligonucleótidos CpG se condensan usando polietilimina (PEI), un polímero catiónico que aumenta la eficacia de la captación celular en células dendríticas.

Los oligonucleótidos CpG se pueden dividir en múltiples clases. Por ejemplo, los CpG-ODN ejemplares abarcados por composiciones, métodos y dispositivos de la presente invención son estimulantes, neutros o supresores. El término "estimulante" describe una clase de secuencias CpG-ODN que activan TLR9. El término "neutral" describe una clase de secuencias CpG-ODN que no activan TLR9. El término "supresor" describe una clase de secuencias CpG-ODN que inhiben TLR9. El término "activar TLR9" describe un procedimiento mediante el cual TLR9 inicia la señalización intracelular.

Los CpG-ODN estimuladores se pueden dividir además en tres tipos A, B y C, que difieren en sus actividades inmunoestimulantes. Los CpG ODN estimulantes de tipo A se caracterizan

por un motivo palindrómico central que contiene CpG fosfodiéster y un cordón fosforotioato 3' poli-G. Después de la activación de TLR9, estos CpG ODN inducen una producción alta IFN-alfa de células dendríticas plasmacitoides (pDC). Los CpG ODN tipo A estimulan débilmente la señalización de NF-κB dependiente de TLR9.

5 Los CpG ODN estimuladores de tipo B contienen una cadena principal completa de fosforotioato con uno o más dinucleótidos CpG. Después de la activación de TLR9, estos CpG-ODN activan fuertemente las células B. A diferencia de los CpG-ODN de tipo A, los CpG-ODNs de tipo B estimulan débilmente la secreción de IFN-α.

Los CpG ODN estimulantes de tipo C comprenden características de los Tipos A y B.

10 Los CpG-ODN de tipo C contienen una cadena principal completa de fosforotioato y un motivo palindrómico que contiene CpG. De forma similar a los CpG ODN Tipo A, los CpG ODN de Tipo C inducen una fuerte producción de IFN-α de pDC. De forma similar a los CpG ODN de tipo B, los CpG ODN de tipo C inducen una estimulación de células B fuerte.

Ejemplos de CpG ODN estimulantes comprenden, pero no se limitan a, ODN 1585, 15 ODN 1668, ODN 1826, ODN 2006, ODN 2006-G5, ODN 2216, ODN 2336, ODN 2395, ODN M362 (todos de InvivoGen). La presente invención también abarca cualquier versión humanizada de los CpG ODN anteriores. En una modalidad preferida, las composiciones, métodos y dispositivos de la presente invención comprenden ODN 1826 (cuya secuencia de 5' a 3' es tccatgacgttcctgacgtt, en donde los elementos CpG están en negrita, SEQ ID NO: 30).

20 Los CpG ODN neutrales y de control que no estimulan TLR9 están abarcados por la presente invención. Estos ODN comprenden la misma secuencia que sus equivalentes estimuladores pero contienen dinucleótidos GpC en lugar de dinucleótidos CpG.

Ejemplos de CpG ODN neutrales o de control abarcados por la presente invención comprenden, pero no se limitan a, control ODN 1585, control ODN 1668, control ODN 1826, control 25 ODN 2006, control ODN 2216, control ODN 2336, control ODN 2395, control ODN M362 (todos de InvivoGen). La presente invención también abarca cualquier versión humanizada de los CpG ODN anteriores.

### **Métodos de tratamiento y administración**

30 Las composiciones de vacuna de la presente invención son útiles para la profilaxis y el tratamiento del cáncer. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de profilaxis contra el cáncer en un sujeto con riesgo de desarrollar cáncer y métodos para tratar el cáncer en un sujeto que necesita dicho tratamiento. En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, mieloma múltiple, glioblastoma multiforme y melanoma. En una 35 modalidad, el cáncer es melanoma.

En una modalidad, una composición de vacuna de la invención se administra a un sujeto que tiene un cáncer asociado con la sobreexpresión de MICA. La sobreexpresión de MICA puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica para medir el nivel de expresión de una proteína o el ácido nucleico correspondiente. Tales métodos incluyen, pero no se

5 limitan a, Western blots, Northern blots, Southern blots, ELISA, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunocitoquímica, las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, y métodos de amplificación de ácidos nucleicos. En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, páncreas, gástrico y carcinoma de colon, linfoma o leucemia.

10 En una modalidad, el cáncer es melanoma. En una modalidad, el cáncer es una malignidad de células plasmáticas, por ejemplo, mieloma múltiple (MM) o condición premaligna de células plasmáticas. En algunas modalidades, se ha diagnosticado que el sujeto tiene un cáncer o está predispuesto al cáncer.

Las composiciones de vacuna de la invención pueden administrarse por separado o

15 como parte de un régimen terapéutico o terapia de combinación, como se describe a continuación. Las composiciones de vacuna de la invención también se pueden administrar individualmente, o en múltiples administraciones, por ejemplo en una estrategia de refuerzo principal. En este contexto, el término "refuerzo inductor" se refiere al uso de dos inmunógenos diferentes en sucesión. Los dos inmunógenos diferentes se administran típicamente sucesivamente después de un período de tiempo

20 tal como de 10 a 30 días o de 10 a 60 días. En una modalidad, el período de tiempo es de 2 a 4 semanas. Así, por ejemplo, en una modalidad, se administra una composición de vacuna de la invención en el tiempo cero y se administra una segunda composición de vacuna de la invención (que comprende un inmunógeno diferente) después de un período de tiempo, por ejemplo de 10 a 30 días, de 10 a 60 días, o de 2 a 4 semanas.

25 La primera y la segunda composiciones de vacuna pueden ser, pero no necesariamente, la misma composición. Por lo tanto, en una modalidad de la presente invención, la etapa de administrar la vacuna comprende administrar una primera composición de vacuna, y luego en un momento posterior, administrar una segunda composición de vacuna.

En una modalidad, una o una pluralidad de diferentes composiciones de vacuna de

30 la invención se administran al sujeto en sitios múltiples como se describe en el documento US 8,110,196. Preferiblemente, cada sitio se drena hacia un ganglio linfático o un grupo de ganglios linfáticos. En una modalidad, una composición de vacuna de la invención se administra a múltiples sitios de drenaje a dos o más ganglios linfáticos seleccionados del grupo que consiste de los ganglios linfáticos de la cabeza y el cuello, los ganglios linfáticos axilares, los ganglios linfáticos traqueobronquiales, los ganglios linfáticos parietales, los ganglios linfáticos gástricos, los ganglios

35

linfáticos ileocólicos y los ganglios linfáticos inguinales y subinguinales. En otra modalidad, los sitios se seleccionan del grupo que consiste en el brazo derecho, el brazo izquierdo, el muslo derecho, el muslo izquierdo, el hombro derecho, el hombro izquierdo, la mama derecha, la mama izquierda, el abdomen, la nalga derecha y la nalga izquierda. En una modalidad, el sitio es o drena a un grupo no  
 5 encapsulado de tejido linfoide seleccionado del grupo que consiste en las amígdalas, las adenoides, el apéndice y los parches de Peyer. En una modalidad, una composición de vacuna de la invención se administra a un sitio que drena al bazo.

En una modalidad, cada composición de vacuna se administra por una ruta seleccionada independientemente del grupo que consiste en intradérmica, subcutánea, transdérmica,  
 10 intramuscular, oral, rectal, vaginal, por inhalación y una combinación de las mismas. En una modalidad, se inyecta al menos una composición directamente en un ganglio linfático anatómicamente distinto, grupo de ganglios linfáticos o grupo no encapsulado de tejido linfoide.

Cualquier ruta de administración adecuada está abarcada por los métodos de la invención, por ejemplo intradérmico, subcutáneo, intravenoso, intramuscular o mucosal. Las vías de  
 15 administración mucosal incluyen, pero no se limitan a, administración oral, rectal, vaginal y nasal. En una modalidad preferida, al menos una composición se administra por vía transdérmica, intradérmica, subcutánea, oral, rectal, vaginal o por inhalación. Cualquier ruta aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) puede usarse para las composiciones de vacuna de la invención. Los métodos de administración ejemplares se describen en el Manual de estándares de  
 20 datos CDER de la FDA, versión número 004 (que está disponible en [fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm](http://fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm)).

Preferiblemente, la ruta de administración se selecciona para dirigir una composición a un sitio particular, por ejemplo, mediante inyección directamente en un ganglio linfático o un grupo de ganglios linfáticos, mediante administración oral para dirigir los ganglios linfáticos del  
 25 estómago, mediante administración anal al objetivo los ganglios linfáticos del recto, por inhalación o aerosol para atacar los ganglios linfáticos de los pulmones, o por cualquier otra vía de administración adecuada.

Cuando los métodos de la invención comprenden administrar una composición de vacuna a sitios múltiples, cada composición se administra preferiblemente al mismo tiempo  
 30 sustancialmente, por ejemplo, dentro de una a ocho horas o durante la misma visita al médico. En una modalidad, cada composición se administra dentro de una a dos horas, dentro de una a tres horas, dentro de una a cuatro horas, o dentro de una a cinco horas.

Cuando la composición de vacuna está en forma de andamio, el método para vacunar a un sujeto comprende implantar la composición de andamio en el sujeto, preferiblemente  
 35 la implantación subcutánea. En ciertas modalidades, el método de vacunación de un sujeto puede

comprender implantar o inyectar la composición de vacuna de andamio en dos o más áreas de la anatomía del sujeto.

En una modalidad, los métodos de la invención comprenden además administrar a las células presentadoras de antígeno en cuestión que se han sensibilizado con al menos un péptido 5 MIC. En una modalidad preferida, las células presentadoras de antígenos son células dendríticas.

En una modalidad, el método comprende además administrar al sujeto uno o más adyuvantes. En una modalidad, uno o más adyuvantes se seleccionan del grupo que consiste en un adyuvante a base de aceite, un adyuvante de ADN CpG, poliinosínico:ácido policitidílico (generalmente abreviado poli(I:C)), un adyuvante de sal mineral, una sal mineral adyuvante en gel, 10 un adyuvante particulado, un adyuvante en micropartículas, un adyuvante en la mucosa y una citoquina. Tales adyuvantes pueden formularse con las composiciones de la invención o administrarse por separado a partir de las composiciones, por ejemplo, antes, al mismo tiempo o después de que las composiciones se administren al sujeto. El uno o más adyuvantes se pueden unir covalentemente al péptido o proteína de fusión de la invención. Por ejemplo, un adyuvante de ADN 15 CpG se une covalentemente al péptido o proteína de fusión de la invención.

Los métodos descritos en este documento pueden aplicarse a una amplia gama de especies, por ejemplo, humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos, ganado, cerdos, ovejas, ciervos, alces, cabras, perros, gatos, mustélidos, conejos, conejillos de Indias, hámsters, ratas y ratones.

20 Los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se usan en el presente documento, se refieren a aliviar, inhibir, mejorar y/o disminuir, parcial o completamente, la enfermedad o afección que padece el sujeto. En algunos casos, el tratamiento puede dar como resultado la ausencia continua de la enfermedad o afección que padece el sujeto.

En general, los métodos incluyen seleccionar un sujeto en riesgo de o con una 25 condición o enfermedad. En algunos casos, la afección o enfermedad del sujeto se puede tratar con una composición farmacéutica descrita en este documento. Por ejemplo, en algunos casos, los métodos incluyen seleccionar un sujeto con cáncer, por ejemplo, en donde el cáncer del sujeto se puede tratar dirigiendo uno o ambos de MICA.

En algunos casos, los métodos de tratamiento pueden incluir una única 30 administración, múltiples administraciones y administración repetida según se requiera para la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad o afección que padece el sujeto. En algunos casos, los métodos de tratamiento pueden incluir la evaluación de un nivel de enfermedad en el sujeto antes del tratamiento, durante el tratamiento y/o después del tratamiento. En algunos casos, el tratamiento puede continuar hasta que se detecte una disminución en el nivel de enfermedad en el 35 sujeto.

Los términos "administrar", "que administra" o "administración", como se usan en el presente documento, se refieren a implantar, absorber, ingerir, inyectar o inhalar el péptido de la invención, independientemente de su forma. En algunos casos, uno o más de los péptidos descritos en este documento pueden administrarse a un sujeto tópicamente (por ejemplo, nasalmente) y/u  
 5 oralmente. Por ejemplo, los métodos en este documento incluyen la administración de una cantidad eficaz de compuesto o composición del compuesto para lograr el efecto deseado o indicado. La dosificación específica y los regímenes de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de  
 10 excreción, combinación de los fármacos, la gravedad y el curso de la enfermedad, condición o síntomas, la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del médico tratante.

Después de la administración, el sujeto puede evaluarse para detectar, evaluar o determinar su nivel de enfermedad. En algunos casos, el tratamiento puede continuar hasta que se detecte un cambio (por ejemplo, reducción) en el nivel de enfermedad en el sujeto.

15 Tras la mejora de la condición del paciente (por ejemplo, un cambio (por ejemplo, disminución) en el nivel de enfermedad en el sujeto), se puede administrar una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de esta invención, si es necesario. Posteriormente, la dosificación o frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, en función de los síntomas, a un nivel en el que se conserva la condición mejorada. Los pacientes  
 20 pueden, sin embargo, requerir tratamiento intermitente a largo plazo ante cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

En algunos casos, la descripción proporciona métodos para detectar células inmunitarias, por ejemplo, células B y/o células B de memoria, de un sujeto humano. Dichos métodos se pueden usar, por ejemplo, para controlar los niveles de células inmunes, por ejemplo,  
 25 células B y/o células B de memoria, en un sujeto humano, por ejemplo, después de un evento. Los ejemplos de eventos pueden incluir, pero no se limitan a, detección de enfermedades, infección; administración de una composición terapéutica descrita en este documento, administración de un agente terapéutico o régimen de tratamiento, administración de una vacuna, inducción de una respuesta inmune. Dichos métodos pueden usarse clínicamente y/o para investigación.

30

### **Cantidades efectivas y dosis**

En una modalidad, una cantidad eficaz de una composición de vacuna de la invención es la cantidad suficiente para reducir la gravedad de un cáncer en un sujeto que tiene cáncer, o la cantidad suficiente para reducir o mejorar la gravedad de uno o más síntomas de la  
 35 misma, la cantidad suficiente para prevenir la progresión del cáncer, la cantidad suficiente para

prevenir además la metástasis del cáncer, la cantidad suficiente para causar la regresión clínica del cáncer, o la cantidad suficiente para mejorar o mejorar el o los efectos terapéuticos de otra terapia o agente terapéutico administrado concurrentemente con, antes o después de una composición de vacuna de la invención.

- 5 Los síntomas del cáncer son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, sin limitación, características inusuales de los lunares, un cambio en la apariencia de un lunar, que incluye asimetría, borde, color y/o diámetro, un área de piel recientemente pigmentada, un lunar anormal, área oscura debajo de las uñas, bultos en el pecho, cambios en el pezón, quistes mamarios, dolor en los senos, muerte, pérdida de peso, debilidad, fatiga excesiva, dificultad para  
10 comer, pérdida de apetito, tos crónica, dificultad para respirar, tos con sangre, sangre orina, sangre en las heces, náuseas, vómitos, metástasis hepáticas, metástasis pulmonares, metástasis óseas, llenura abdominal, hinchazón, fluido en la cavidad peritoneal, sangrado vaginal, estreñimiento, distensión abdominal, perforación del colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, vómitos con sangre, sudoración intensa, fiebre, presión arterial alta, anemia, diarrea, ictericia,  
15 mareos, escalofríos, espasmos musculares, metástasis del colon, metástasis en el pulmón, metástasis en la vejiga, metástasis en el hígado, metástasis en los huesos, metástasis en los riñones y metástasis pancreáticas, dificultad para tragar y similares.

En una modalidad, la cantidad eficaz de una composición de vacuna de la invención es la cantidad suficiente para producir una respuesta inmune mediada por células B secretoras de  
20 anticuerpos o células T citotóxicas dirigida contra uno o más de los péptidos de las composiciones de vacuna de la invención. En una modalidad, la cantidad efectiva de una composición de vacuna de la invención es la cantidad suficiente para producir una respuesta inmune mediada por células B secretoras de anticuerpos o células T citotóxicas dirigidas contra una célula cancerosa. La capacidad de las composiciones de vacuna de la invención para provocar una respuesta inmune puede  
25 determinarse usando cualquier método de rutina disponible para los expertos en la técnica. En una modalidad, la cantidad eficaz de cada composición es la cantidad suficiente para producir una respuesta de células T citotóxicas en el sujeto según se mide, por ejemplo, mediante un ensayo de células T de linfocitos mixtos.

En una modalidad, la cantidad eficaz de la composición de vacuna administrada al  
30 sujeto, o en un sitio particular del sujeto, es la cantidad que administra de 1 a 1000 microgramos del uno o más péptidos de la composición. En una modalidad, la cantidad de péptidos es de 1 a 100 microgramos, de 1 a 200 microgramos, de 1 a 300 microgramos, de 1 a 400 microgramos, de 1 a 500 microgramos, de 1 a 600 microgramos, de 1 a 700 microgramos, de 1 a 800 microgramos, o de 1 a 900 microgramos. En otra modalidad, la cantidad de péptidos es de 1 a 10 microgramos, de 1 a  
35 20 microgramos, de 1 a 30 microgramos, de 1 a 40 microgramos, de 1 a 50 microgramos, de 1 a 60

microgramos, de 1 a 70 microgramos, de 1 a 80 microgramos, o 1 a 90 microgramos. En una modalidad, la cantidad total de péptidos administrados a un sujeto no supera 5 miligramos. En una modalidad, la cantidad total de péptidos administrados a un sujeto no supera 2 miligramos.

## 5 **Terapia de combinación**

La presente invención también proporciona métodos para el tratamiento o la profilaxis del cáncer que comprenden administrar una composición de vacuna de la invención a un sujeto que lo necesita, junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales o regímenes terapéuticos. En una modalidad, una composición de vacuna de la invención se administra como  
10 parte de un régimen terapéutico que incluye cirugía, un agente quimioterapéutico o radioterapia, una inmunoterapia o cualquier combinación de los anteriores.

En una modalidad, el régimen terapéutico comprende o comprende adicionalmente uno o más agentes inmunoestimulantes. En una modalidad, uno o más agentes inmunoestimulantes se seleccionan del grupo que consiste en un anticuerpo o péptido anti-CTLA-4, un anticuerpo o  
15 péptido anti-PD-1, un anticuerpo o péptido anti-PDL-1, un anticuerpo o péptido anti-PDL-1, un anticuerpo o péptido anti-OX40 (también conocido como CD134, TNFRSF4, ACT35 y/o TXGP1L), un anticuerpo o péptido anti-GITR (también conocido como TNFRSF18, AITR y/o CD357), un anticuerpo o péptido anti-LAG-3, y/o un anticuerpo o péptido anti-TIM-3.

En una modalidad, uno o más agentes inmunoestimulantes se seleccionan de un  
20 anticuerpo anti-MICA descrito en WO 2013/049517 o WO 2008/036981. En una modalidad, uno o más agentes inmunoestimulantes se seleccionan de CM33322 Ab4, CM33322 Ab28 y CM33322 Ab29, que se describen en la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nos. 61/792,034 y 61/913,198 y en la Solicitud de Estados Unidos No. 14/025,573.

En una modalidad, el régimen terapéutico comprende o comprende adicionalmente  
25 una o más citoquinas. En una modalidad, las composiciones de vacuna de la invención comprenden una o más citoquinas. En una modalidad, al menos una citoquina es una interleuquina o un interferón. En una modalidad, al menos una citoquina es una interleuquina seleccionada del grupo que consiste en IL-1.alfa, IL-1.beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15 e IL-18. En otra modalidad, al menos una citoquina es un interferón seleccionado de IFNalfa,  
30 IFNbeta e IFNgamma.

En una modalidad, una composición de vacuna de la invención se administra como parte de un régimen terapéutico que incluye administrar al sujeto al menos un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de histona deacetilasa ("HDAC"), inhibidores de proteasoma, agentes alquilantes, e inhibidores de topoisomerasa.

35 En una modalidad, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de HDAC

seleccionado del grupo que consiste en ácido hidroxámico, Vorinostat (Zolinza), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) (Merck), Tricostatina A (TSA), LAQ824 (Novartis), Panobinostat (LBH589) (Novartis), Belinostat (PXD101) (CuraGen), ITF2357 Italfarmaco SpA (Cinisello), tetrapéptido cíclico, Depsipéptido (romidepsina, FK228) (Gloucester Pharmaceuticals), Benzamida, Entinostat (SNDX-  
 5 275/MS-275) (Syndax Pharmaceuticals), MGCD0103 (Celgene), ácidos alifáticos de cadena corta, ácido valproico, butirato de fenilo, AN-9, pivanex (Titan Pharmaceutical), CHR-3996 (Chroma Therapeutics), y CHR-2845 (Chroma Therapeutics).

En una modalidad, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de proteasoma seleccionado del grupo que consiste en Bortezomib, (Millennium Pharmaceuticals), NPI-0052 (Nereus  
 10 Pharmaceuticals), Carfilzomib (PR-171) (Onyx Pharmaceuticals), CEP 18770 y MLN9708.

En una modalidad, el agente quimioterapéutico es un agente alquilante tal como mefalan.

En una modalidad, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa tal como Adriamicina (doxorubicina).

15 En una modalidad, el régimen terapéutico comprende o comprende además uno o más de quimioterapia, radioterapia, citoquinas, quimioquinas y otras moléculas de señalización biológica, vacunas específicas de tumor, vacunas de cáncer celular (por ejemplo, células de cáncer transducidas con GM-CSF), anticuerpos monoclonales específicos de tumor, rescate de células madre autólogas y alogénicas (por ejemplo, para aumentar los efectos del injerto contra tumor), otros  
 20 anticuerpos terapéuticos, terapias dirigidas moleculares, terapia antiangiogénica, agentes infecciosos con intención terapéutica (tales como bacterias localizadoras de tumores) y terapia génica.

### **Kits**

La invención proporciona un paquete o kit farmacéutico para llevar a cabo los  
 25 métodos o regímenes terapéuticos de la invención. En una modalidad, el kit comprende una composición de vacuna de la invención en forma liofilizada. En una modalidad, el kit comprende una composición de vacuna de la invención en forma de un andamio de proteína.

En otra modalidad, el kit comprende además en uno o más contenedores adicionales una citoquina o un adyuvante.

30 La composición en cada recipiente puede estar en forma de una solución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en combinación con solución salina estéril, solución de dextrosa, o solución amortiguada, u otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, la composición puede ser liofilizada o desecada; en este caso, el kit opcionalmente comprende adicionalmente en un recipiente separado una solución farmacéuticamente aceptable  
 35 (por ejemplo, solución salina, dextrosa, etc.), preferiblemente estéril, para reconstituir la

composición para formar una solución para fines de inyección.

En otra modalidad, el kit comprende además uno o más dispositivos reutilizables o desechables para administración (por ejemplo, jeringas, agujas, plumas dispensadoras), preferiblemente envasados en forma estéril, y/o una compresa de alcohol envasada. Las

- 5 instrucciones se incluyen opcionalmente para la administración de las composiciones por un médico o por el paciente. El kit también puede comprender otros materiales, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un paquete blíster.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para usar una cualquiera o más de las composiciones de vacuna (indicadas a continuación como "X") descritas en  
10 este documento en los siguientes métodos.

La sustancia X para su uso como medicamento en el tratamiento de una o más enfermedades o afecciones descritas en este documento (por ejemplo, cáncer, al que se hace referencia en los siguientes ejemplos como 'Y'). El uso de la sustancia X para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de Y; y sustancia X para uso en el tratamiento de Y.

- 15 En algunos casos, las composiciones terapéuticas descritas en este documento pueden formularse para su venta en los Estados Unidos, su importación a los Estados Unidos y/o su exportación desde los Estados Unidos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto  
20 habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales se describen en el presente documento para su uso en la presente invención; otros, métodos y materiales conocidos en la técnica adecuados también se pueden utilizar. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, secuencias, las entradas de base de datos, y otras referencias mencionadas en el presente  
25 documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, tendrá control.

## **EJEMPLOS**

30

### **EJEMPLO 1**

#### **Métodos Generales**

##### Construcción de vectores

- 35 Las vacunas multivalentes inducen respuestas de anticuerpos de título sustancialmente mayor que las proteínas monovalentes. Aquí se usa una representación multivalente

en la que el dominio alfa 3 de MICA se fusiona con la ferritina *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Se ha demostrado recientemente que las nanopartículas basadas en ferritina inducen anticuerpos de alto título para las vacunas de influenza y EBV. La ferritina se encuentra en la mayoría de los organismos como una proteína de almacenamiento de hierro. La ferritina es una partícula autoensamblada que

5 forma una partícula esférica con simetría octaédrica, que consta de 24 subunidades. Véanse las figuras 1C y 1D para un esquema de una partícula de ferritina, así como un mapa que demuestra la respuesta inmune celular y humoral contra la ferritina humana y de ratón. El gen de fusión de ferritina MICA alfa 3 (abreviado como ferritina MICA) se generó fusionando el gen que codifica el dominio  $\alpha 3$  de MICA con la ferritina *H. pylori* usando un enlazador Gly-Ser-Gly (figura 2A). Se

10 introdujo una mutación puntual (Asn19Gln) en la ferritina de *H. pylori* para suprimir un posible sitio de N-glicosilación. Para determinar la respuesta de anticuerpos de  $\alpha 3$  MICA solo (sin la ferritina), se generó la versión desglucosilada del gen  $\alpha 3$  de MICA mutando 7 de 8 sitios potenciales de N-glicosilación a Asp o Gln. Se incluyó una etiqueta de HA C-terminal para el propósito de purificación de proteínas aguas abajo. Los genes se sintetizaron utilizando la plataforma de síntesis génica

15 GeneArt® y el codón optimizado para la expresión de células de insectos. Los genes sintetizados se clonaron en el vector de expresión de baculovirus pAcDB3. (Ver la figura 2C).

En las figuras 2B y 2D se presentan los ensayos que demuestran la generación de la vacuna de dominio alfa 3 de MIC y la generación de la vacuna alfa 3 de MICA desglucosilada, respectivamente.

## 20 Biosíntesis y purificación de proteínas

Las proteínas de fusión de ferritina  $\alpha 3$  de MICA y MICA se expresaron en células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) infectando estas células con baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección de 10. Las células se cultivaron en medio de expresión libre de suero Sf900 (Life Technologies) y los sobrenadantes cultivados se recogieron 3 días después de la transfección.

25 Los sobrenadantes se concentraron y luego se intercambiaron en regulador de pH Tris (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, regulador de pH de pH 7.5). Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad con HA y los agregados se eliminaron realizando la cromatografía de exclusión por tamaño usando la columna Superosa 6 (GE Healthcare). Las proteínas purificadas se intercambiaron en regulador de pH en PBS utilizando columnas de desalación PD-10 (GE) y se concentraron a 1 mg/ml

30 usando filtros centrífugos Amicon Ultra de 4 ml. La pureza y el tamaño de la proteína se verificaron mediante SDS-PAGE.

## Preparación de vacuna e inmunización MPS

La vacuna de andamio descrita aquí se informó recientemente (Kim et al Nat. Biotechnol. 2015, 33, 64-72). Las barras de sílice mesoporosas (MSR) inyectadas con una aguja

35 se ensamblan espontáneamente in vivo para formar una estructura macroporosa que se asemeja

a un pajar que proporciona un microambiente celular 3D para las células dendríticas. Este andamio biodegradable recluta y educa a las células dendríticas que luego migran a los ganglios linfáticos donde inducen una respuesta inmune. Se cargaron 5 mg de MSR con 1 µg de GM-CSF (para reclutar células dendríticas), 100 µg de oligonucleótido CpG (para inducir la activación de 5 células dendríticas) y 200 µg de fusión de ferritina MICA o una proteína de control (ovoalbúmina) durante 12 horas a temperatura ambiente. Las partículas se liofilizaron, se resuspendieron en PBS y se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de ratones C57BL/6. Los ratones reciben un refuerzo los días 14 o 21 después de la inmunización inicial. Los ratones no inmunizados emparejados por la edad (sin tratamiento previo) y los ratones inmunizados con ovoalbúmina se usaron como grupos de 10 control para los experimentos de inmunización con ferritina MICA. Como control adicional en el experimento α3 de MICA, los ratones se inmunizaron con todos los componentes de la vacuna pero sin el andamiaje MSR (bolo).

#### Experimento de metástasis pulmonar en ratones inmunizados con ferritina α3 de MICA y MICA

15 Se inmunizaron ratones C57BL/6J con vacuna de α3 de MICA o α- ferritina de MICA. Tres semanas después del refuerzo, los ratones se expusieron a una inyección intravenosa (i.v) de  $0.5 \times 10^6$  MICA que expresan células de melanoma B16F10. Los sueros se recogieron antes de la prueba tumoral y a intervalos semanales para analizar los niveles de MICA. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la exposición al tumor; los pulmones se recogieron y se fijaron en 20 formalina amortiguada neutra al 10% y se cuantificó el número de metástasis pulmonares.

#### Análisis de citometría de flujo y ELISA para determinar los títulos de anticuerpos MICA en ratones inmunizados

Los títulos de anticuerpos específicos de MICA se analizaron mediante ELISA usando el dominio extracelular de longitud completa de MICA. Se recubrió proteína MICA de longitud 25 completa (0.2 µg) en una placa ELISA de 96 pozos durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con PBS/BSA al 2%. Las placas se lavaron e incubaron con dilución en serie de sueros recogidos a intervalos semanales de cada grupo experimental. Se usó HRP de cabra anti-ratón como anticuerpo de detección. El análisis de citometría de flujo se usó para evaluar la unión de anticuerpos séricos a la longitud completa expresada en la superficie de las 30 células tumorales. Brevemente, se incubaron  $1 \times 10^5$  células tumorales con 1 µl de suero durante 2 horas a 4°C.  $1 \times 10^5$  células se tiñeron con 1 µl de suero de ratones no inmunizados (sin tratamiento previo), ratones inmunizados con componentes de vacuna sin el andamiaje MSR (bolo) o vacuna de ferritina MICA (vacunada) en 100 µl de PBS durante 2 horas. El anticuerpo monoclonal 6D4 comercialmente disponible que se une a los dominios alfa1-alfa2 de MICA se usó como control 35 positivo (10 µg). Se usó IgG anti-ratón conjugada con PE como anticuerpo secundario.

## **EJEMPLO 2**

### **Vacuna de andamio para la inducción de la respuesta inmune potente**

El dominio  $\alpha 3$  de MIC se expresó como una proteína recombinante en el sistema  
 5 Baculovirus; la proteína se mostró en una forma multivalente sobre la ferritina de *H. pylori*, una  
 proteína de almacenamiento de hierro con 24 subunidades idénticas. Una vacuna se aproximó  
 usando barras de sílice mesoporosas (MSR) descritas originalmente en Kim et al Nat. Biotechnol.  
 2015, 33, 64-72 se usó aquí, y se incorporó aquí como referencia en su totalidad (ver la figura 3).  
 Las MSR que se inyectan por vía subcutánea con una aguja se ensamblan espontáneamente in vivo  
 10 en estructuras macroporosas que proporcionan un microambiente celular 3D para las células  
 inmunes hospederas. Este sistema recluta un gran número de células inmunes, las expone a los  
 antígenos relevantes y también proporciona las señales moleculares apropiadas para la inducción de  
 una respuesta inmune potente. La proteína de dominio  $\alpha 3$  de MIC se absorbió a MSR, junto con GM-  
 CSF (para el reclutamiento de células dendríticas) y oligonucleótido CpG (un adyuvante que activa  
 15 las células dendríticas). Este enfoque de vacunación permitió la inducción de anticuerpos de alto  
 título específicos para el dominio  $\alpha 3$  de MIC. Estos anticuerpos tiñeron células tumorales que  
 expresan MIC e inhibieron el desprendimiento de MIC por las células tumorales.

Para evaluar la actividad antitumoral de esta vacuna, utilizamos células de melanoma  
 B16 transfectadas con MIC de humano. Cuando estas células tumorales se inyectan por vía  
 20 intravenosa en ratones no inmunizados, forman un gran número de metástasis pulmonares (~200  
 metástasis/ratón). La vacuna de andamio MSR proporcionó una protección potente contra el  
 crecimiento de tales metástasis. Cuando los componentes de la vacuna se inyectaron como un bolo  
 sin el andamio MSR, se observó una protección parcial, pero el efecto biológico fue  
 significativamente más débil. Este resultado muestra que el reclutamiento local de células inmunes al  
 25 andamio MSR aumenta en gran medida la actividad de esta vacuna. (Ver las figuras 4A y 4B).

## **EJEMPLO 3**

### **Vacunación con la proteína de fusión de ferritina MICA induce títulos altos de anticuerpos específicos de MICA**

30

La unión de anticuerpos específicos de  $\alpha 3$  MICA en los sueros de ratones  
 inmunizados a MICA de longitud completa expresada en la superficie de células de melanoma de  
 ratón B16F10 se ensayó mediante citometría de flujo. Brevemente,  $1 \times 10^5$  células se tiñeron con 1  
 $\mu$ l de suero de ratones no inmunizados (sin tratamiento previo), ratones inmunizados con vacuna de  
 35 control (proteína OVA) o vacuna ferritina MICA de los días 14, 28 y 42 (vacunados) en 100  $\mu$ l de PBS

por 2 horas. El anticuerpo monoclonal 6D4 comercialmente disponible que se une a los dominios  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  de MICA se usó como control positivo (10  $\mu$ g). Se usó IgG anti-ratón conjugada con PE como anticuerpo secundario. Anticuerpos específicos de  $\alpha 3$  de MICA en los sueros de ratones vacunados (histogramas - verde (d14), azul (d28), rojo (d42) mostraron una unión significativa a MICA

5 expresado en la superficie de la célula tumoral (figuras 5A y 5B). Los resultados de estos ensayos demuestran que la vacunación con proteína de fusión ferritina MICA induce títulos elevados de anticuerpos específicos de MICA.

#### **EJEMPLO 4**

##### **10 Vacunación con proteína de fusión de ferritina MICA genera altos niveles de la respuesta de anticuerpo policlonal específica de MICAA3 IGG1, IGG2A e IGG3**

Los sueros de ratones inmunizados con ferritina MICA se analizaron mediante ELISA para determinar las diferentes subclases de IgG inducidas tras la vacunación. Se usaron sueros de ratones

15 inmunizados con proteína OVA (bolo) o ratones no inmunizados (sin tratamiento previo) como grupos de control. Se utilizó MICA de longitud completa como antígeno de captura y se utilizó una dilución de suero de 1/1000 en cada pozo. Se usaron IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 anti-ratón conjugadas con HRP para la detección. Se encontró que la inmunización con ferritina MICA (vacunada) induce niveles elevados de todas las subclases de IgG probadas (ver la figura 6).

20

#### **EJEMPLO 5**

##### **Anticuerpos policlonales generados en respuesta a la vacuna de ferritina MICA previenen el desprendimiento de MICA de la superficie de la línea celular de melanoma metastásico humano**

25

Inducción de anticuerpos MICA en pacientes con melanoma tratados con vacuna tumoral autóloga (GVAX) más Ipilimumab, correlacionada con niveles reducidos de MICA soluble en suero (sMICA). La parte extracelular de MICA/B contiene dos dominios tipo MHC de clase I ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) y un dominio de inmunoglobulina proximal a la membrana ( $\alpha 3$ ). Se ha demostrado que el

30 disulfuro isomerasa ERp5 escinde el enlace de disulfuro estructural en el dominio  $\alpha 3$  de MICA, y el desprendimiento resultante de este dominio permite la escisión proteolítica mediante ADAM 10, ADAM 17 y MMP-14. El propósito de este ensayo fue determinar si los anticuerpos policlonales generados en respuesta a la vacuna de ferritina MICA previenen el desprendimiento de MICA de la línea celular de tumor de melanoma humano A375.

35

Para estos ensayos, se colocaron en placas  $4 \times 10^5$  células de melanoma maligno

A375 en una placa de 96 pozos con 200  $\mu$ l de medio. Las células se incubaron sin suero o con suero de ratones sin tratamiento previo, inmunizados con proteína OVA o vacunados con ferritina MICA (figura 7 barras con triángulo invertido) durante 24 horas. sMICA en el sobrenadante se analizó utilizando el kit MICA ELISA que utiliza anticuerpos del dominio  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 de MICA para la captura y 5 detección. Se detectaron niveles más bajos de sMICA en el sobrenadante de células incubadas con suero de ratones vacunados con ferritina MICA (figura 7 barras con triángulo invertido) en comparación con células incubadas sin suero, suero de ratones sin tratamiento previo (figura 7 barras con círculos y cuadrados) o ratones inmunizados con proteína OVA (figura 7 barras con triángulo), lo que indica que los anticuerpos específicos de  $\alpha$ 3 de MICA pueden inhibir el 10 desprendimiento de MICA de la superficie de la célula tumoral.

### **EJEMPLO 6**

#### **Actividad terapéutica de la vacuna de ferritina MICA**

15 La actividad terapéutica de la vacuna de ferritina MICA se probó usando un modelo de tumor de melanoma B16F10 altamente agresivo. Las células tumorales de melanoma B16F10 se modificaron genéticamente para expresar MICA humano. MICA está unido al receptor murino NKG2D, lo que lo convierte en un sistema modelo adecuado. Ratones C57BL/6 inmunizados con la vacuna de ferritina MICA, vacuna de proteína OVA (antígeno de control) y ratones de control no 20 inmunizados (edad y sexo apareados) fueron expuestos a inyección i.v de células tumorales B16F10-MICA. Los sueros se recogieron antes del desafío tumoral, el día 7 y el día 13. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la prueba tumoral y se cuantificó el número de metástasis pulmonares (véase la figura 8A).

Para estos ensayos, se inmunizaron ratones hembras C57BL/6 de 8 semanas de 25 edad con ferritina alfa 3 de MICA o proteína OVA, seguido de un refuerzo el día 28. Tres semanas después, los ratones fueron desafiados por i.v. de  $5 \times 10^5$  células de melanoma B16F10 que expresan MICA. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la prueba tumoral y se cuantificó el número de metástasis pulmonares. El nivel de MICA desprendida (sMICA) en el suero fue monitoreado por ELISA. Estos experimentos demostraron que los ratones vacunados con ferritina MICA estaban casi 30 libres de tumor. Por el contrario, el grupo de control de igual edad no inmunizado (sin tratamiento previo) y los ratones vacunados con antígeno control - ovoalbúmina tenían un gran número de metástasis pulmonares (promedio de  $\sim 150$  metástasis de pulmón/ratón) (figura 8A). Es importante destacar que sMICA era indetectable en sueros de ratones inmunizados con vacuna de ferritina MICA (triángulo) mientras que se detectaron niveles elevados de sMICA en las dos semanas posteriores a 35 la exposición tumoral en el suero de ratones inmunizados con ovoalbúmina (cuadrado) y el grupo

control no inmunizado (círculo) (figura 8B).

### **EJEMPLO 7**

#### **Determinación de la dosificación eficaz de la vacuna de ferritina MICA y la cinética de la respuesta policlonal de anticuerpos In Vivo**

Para estos estudios, los ratones recibieron dos inyecciones de la vacuna antes del desafío de la célula tumoral. Sin embargo, los niveles de anticuerpos casi máximos ya se logran dos semanas después de la inmunización inicial. Con el fin de determinar la dosis de vacunación óptima y la cinética de la respuesta de anticuerpos policlonales a diferentes dosis, se inmunizaron ratones C57Bl/6J con diferentes dosis de proteína de ferritina MICA (50-200  $\mu$ g) absorbida por MSR. Los ratones recibieron refuerzo el día 17. Los sueros se recogieron a intervalos semanales por sangrado retro-orbital para determinar los títulos de anticuerpos MICA por ELISA. El día 25 después de la inmunización inicial, los ratones fueron desafiados con inyección i.v. de MICA que expresa células de melanoma B16F10. Los sueros se recogieron antes de la prueba tumoral y a intervalos semanales para analizar los niveles de MICA. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la exposición al tumor; los pulmones se recogieron y se fijaron en formalina amortiguada neutra al 10% y se cuantificó el número de metástasis pulmonares.

Para estos estudios, se inmunizaron ratones hembras C57BL/6 de 8 semanas de edad con vacuna de ferritina MICA alfa 3 en diferentes dosis (50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g o 200  $\mu$ g) y se reforzaron el día 17. El título de anticuerpos del punto final se determinó diluyendo en serie los sueros y probando su unión a la proteína MICA de longitud completa mediante ELISA. Los ratones inmunizados con ferritina MICA provocaron altos niveles de títulos de anticuerpos el día 14 (títulos de ELISA de  $10^5$ ) a todas las dosis probadas y el título aumentó ~1000 veces después del refuerzo el día 17. Se usaron ratones de igual edad no tratados, sin tratamiento previo, como el grupo de control (véase la figura 9A).

El día 25 después de la inmunización inicial, los ratones fueron desafiados con inyección i.v. de  $0.5 \times 10^6$  MICA que expresa células de melanoma B16F10. Los sueros se recogieron antes de la prueba tumoral y a intervalos semanales para analizar los niveles de MICA. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la exposición al tumor; los pulmones se recogieron y se fijaron en formalina amortiguada neutra al 10% y se cuantificó el número de metástasis pulmonares. Los ratones inmunizados con 100  $\mu$ g y 200  $\mu$ g estaban casi libres de tumor en comparación con los ratones inmunizados con 50  $\mu$ g de la vacuna (~2-12  $\mu$ m de metástasis de pulmón). sMICA fue indetectable en los sueros de ratones inmunizados con diferentes dosis de vacuna de ferritina MICA (50 $\mu$ g -cuadrado, 100  $\mu$ g- triángulo ascendente, 200  $\mu$ g- triángulo

descendente) mientras que se detectaron niveles altos de sMICA dentro de las dos semanas posteriores al desafío tumoral en el grupo de control no inmunizado sérico (círculo vacío) (véanse las figuras 9B y 9C).

5

### **EJEMPLO 8**

#### **Vacuna MICA $\alpha$ 3 sola induce títulos elevados de anticuerpos específicos de MICA**

Para determinar el efecto de la vacuna  $\alpha$ 3 de MICA sola (sin ferritina) en la generación de respuesta del anticuerpo policlonal específica de MICA, se generó la versión  
10 desglucosilada del gen  $\alpha$ 3 de MICA mutando 7 de 8 sitios potenciales de N-glicosilación a Asp o Gln. Después de la producción y purificación de proteínas como se describe en la sección de métodos, la vacuna de  $\alpha$ 3 de MICA se preparó cargando 5 mg de MSR con 1  $\mu$ g de GM-CSF, 100  $\mu$ g de CpG-ODN y 150  $\mu$ g de proteína  $\alpha$ 3 de MICA desglucosilada (vacuna abreviada  $\alpha$ 3 de MICA). Las partículas se liofilizaron a continuación, se resuspendieron en PBS frío (150  $\mu$ l) y se inyectaron por vía subcutánea  
15 en el flanco de ratones hembra C57Bl/6J. Los ratones inmunizados con todos los componentes de la vacuna pero sin el andamio MSR (bolo) y los ratones de igual edad no tratados se usaron como grupos de control. Se recogieron sueros a intervalos semanales mediante hemorragia retro-orbital. Los ratones recibieron refuerzo el día 28 después de la inmunización inicial.

Para estos estudios,  $1 \times 10^5$  MICA009 que expresan células de melanoma B16F10 se  
20 tiñeron con 1  $\mu$ l de suero de ratones no inmunizados (sin tratamiento previo), ratones inmunizados con  $\alpha$ 3 de MICA sin MSR (bolo) o vacuna  $\alpha$ 3 de MICA (vacunada) en 100  $\mu$ l de PBS durante 2 horas. El anticuerpo monoclonal 6D4 comercialmente disponible que se une a los dominios  $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 de MICA se usó como control positivo (10  $\mu$ g). Se usó IgG anti-ratón conjugada con PE como anticuerpo secundario. Los anticuerpos específicos de  $\alpha$ 3 de MICA en los sueros de los grupos de ratón y bolo  
25 vacunados mostraron una unión significativa a MICA expresada en la superficie de la célula tumoral, con niveles similares al grupo de control positivo después del refuerzo (véase la figura 10A).

Se ensayaron sueros de ratones inmunizados con  $\alpha$ 3 de MICA en ELISA para determinar las diferentes subclases de IgG inducidas tras la vacunación. Se usaron sueros de ratones no inmunizados como grupos de control. Se utilizó MICA de longitud completa como antígeno de  
30 captura y se utilizó una dilución de suero de 1/1000 en cada pozo. Se usaron IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 anti-ratón conjugadas con HRP para la detección. Se descubrió que la inmunización con la vacuna de  $\alpha$ 3 de MICA y la vacuna en bolo inducen la producción de todas las subclases de IgG analizadas, con niveles de IgG1 más altos que la vacuna de ferritina MICA (véase la figura 10B).

**EJEMPLO 8****La vacuna MICA3 sola (sin fusión de ferritina) muestra un beneficio terapéutico significativo In Vivo**

5                    Para estos estudios, se inmunizaron ratones hembra C57Bl/6J de 8 semanas de edad con vacuna de  $\alpha 3$  de MICA o bolo que consistía en todos los componentes de la vacuna pero sin el andamio MSR. Se usaron ratones hembra C57Bl/6J no tratados, de igual edad, como grupo de control. Tres semanas después del refuerzo, los ratones fueron desafiados con inyección i.v. de  $0.5 \times 10^6$  MICA que expresa células de melanoma B16F10. Los ratones se sacrificaron 14 días después

10 de la exposición al tumor; los pulmones se recogieron y se fijaron en formalina amortiguada neutra al 10% y se cuantificó el número de metástasis pulmonares. Los ratones vacunados con  $\alpha 3$  de MICA estaban casi libres de tumor en comparación con el grupo de control de igual edad, no tratado. El número de metástasis pulmonares fue significativamente menor en el grupo de bolo ( $\sim 100$ -125) en comparación con el grupo no inmunizado ( $\sim 200$ -250) (ver la figura 11A).

15                    sMICA fue indetectable en sueros de ratones inmunizados con vacuna de  $\alpha 3$  de MICA (triángulo) mientras que se encontraron niveles elevados de sMICA en el grupo de control no tratado dentro de las dos semanas posteriores al desafío tumoral (círculo). El grupo de bolo tuvo niveles relativamente bajos de sMICA en el suero (cuadrado) en comparación con el grupo de control. (Ver la figura 11B). El mayor número de metástasis pulmonares y niveles de sMICA en

20 ratones inmunizados con bolo de  $\alpha 3$  de MICA en comparación con el grupo vacunado es más probable debido a los niveles observados de reducción en títulos de anticuerpos específicos de MICA el día 62 después de la inmunización inicial en comparación con el grupo vacunado (datos no mostrados).

25

**EJEMPLO 9****Determinación de poblaciones de linfocitos citotóxicos que se requieren para la eficacia de la vacuna**

Al agotar las células T CD8 o las células NK con mAbs, se descubrió que tanto las

30 células T CD8 como las células NK contribuyen al efecto terapéutico de la vacuna (figuras 13A a 13B y 14A a 14B).

**EJEMPLO 10****Ensayo ELISA para la cuantificación de anticuerpos MIC**

Se usa un ensayo ELISA para la cuantificación de anticuerpos MIC inducidos por la  
 5 vacuna (figura 6).

**EJEMPLO 11****Estudios futuros**

10 Los siguientes son estudios futuros que se realizarán para evaluar mejor el  
 rendimiento de la vacuna.

1. Las formulaciones de vacuna se optimizarán probando la cantidad óptima de antígeno y comparando dos adyuvantes, oligonucleótido CpG y Poli (I:C).
2. La eficacia de la vacuna se probará en modelos de tumores múltiples,  
 15 específicamente el modelo de melanoma B16-MIC (modelos subcutáneos y de metástasis) y el  
 modelo ortotópico TRAMP-MIC de cáncer de próstata. Estos estudios implican la medición de la  
 eficacia de la vacuna mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento tumoral y la reducción  
 del MIC desprendido en el suero.
3. Se transferirán sueros de ratones inmunizados a receptores no inmunizados para  
 20 examinar si los anticuerpos específicos de MIC inducidos son suficientes para la protección  
 proporcionada por la vacuna.
4. Determinación de si la vacuna proporciona protección contra el desafío secundario  
 por células tumorales que carecen de expresión de MIC debido a la inducción de una respuesta de  
 células T CD8 frente a otros antígenos tumorales. Los ratones que sobreviven al modelo de  
 25 metástasis B16-MIC serán desafiados por inyección i.v. de una dosis alta de células tumorales B16  
 que expresan o no expresan MIC.

Se realizarán investigaciones adicionales de los biomarcadores que reflejan la  
 actividad mecánica de los anticuerpos inducidos. Estos incluirán los siguientes enfoques.

1. Ensayo de ELISA para detectar el MIC en el suero; un ensayo está disponible y  
 30 será rigurosamente probado con muestras de suero de pacientes con cáncer avanzado.
2. Prueba de la actividad funcional de anticuerpos inducidos por el dominio  $\alpha 3$  de  
 MIC. Qué líneas de células tumorales humanas son óptimas para los ensayos que evalúan la  
 inhibición mediada por anticuerpos del desprendimiento de MIC (se dispone de un panel de líneas  
 celulares) se estudiarán.
3. Análisis de citometría de flujo de células inmunitarias en sangre periférica y  
 35

biopsias de tumores. Es particularmente importante la cuantificación de los niveles de NKG2D en la superficie por células T CD8 y células NK; los anticuerpos están disponibles y el panel será optimizado.

5

### **EJEMPLO 12**

#### **Expresión de Baculovirus de MICA002 alfa 3 fusionada a ferritina (H. Pylori)**

**Propósito: Expresión de células de insecto de alfa 3 de MICA (002) fusionada a nanopartículas de ferritina**

10

Diseño general:

Péptido de señal, 6 his tag, enlazador, péptido HA N-terminal, dominio alfa 3 de MICA (\* 002: 01),

Enlazador de GSG, ferritina de H. pylori, codón de interrupción

15

```

1      MVPCTLLLLL AAALAPTQTR AHHHHHHH SKS YPYDVDPDYAR péptido de
señal, 6HIS, enlazador, HA
41      TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG MICA alfa 3
81      VSLSHDTQQW GDVLPDGNGT YQTWVATRIS QGEEQRFTCY
121     MEHSGNHSTH PVP SGKVLVL QSHWQTFHGS GDI IKLLNEQ enlazador,
20     ferritina
161     VNKEMQSSNL YMSMSSWCYT HSLDGAGLFL FDHAAEEYEH
201     AKKLIIFLNE NNPVQLTSI SAPEHKFEGF TQIFQKAYEH
241     EQHISESINN IVDHAIKSKD HATFNFLQWY VAEQH EEEVL
281     FKDILDKIEL IGNENHGLYL ADQYVKGIAK SRKS* (SEQ ID NO: 5)

```

25

**Estrategia: Clonar en el vector pacDB3 entre los sitios SmaI y BamHI**

**Estrategia: Clonar en el vector pacDB3**

Traducción de DNAMAN18(1-945)

30

Código universal

Número de aminoácido total: 314, MW=35668

Max ORF: 1-942, 314 AA, MW=35668

35

```

1      ATGGTCCCCTGTACCCTGCTGCTGCTGGCTGCTGCACTGGCACCTACTCAGACTCGG
1      M V P C T L L L L L A A A L A P T Q T R
61      GCCCACCATCATCACCATCACTCAAAAAGTTACCCCTACGATGTCCCCGACTACGCCAGG
40      21      A H H H H H H S K S Y P Y D V P D Y A R
121     ACCGTGCCCCCTATGGTGAACGTCACACGCTCAGAAGCTAGCGAGGGCAATATCACCGTG
45      41      T V P P M V N V T R S E A S E G N I T V
181     ACATGCCGAGCATCTGGGTTCTATCCTTGAACATTACACTGAGTTGGAGGCAGGACGGG
61      T C R A S G F Y P W N I T L S W R Q D G
50      241     GTGTCCCTGTCTCACGATACTCAGCAGTGGGGCGACGTGCTGCCAGATGGCAATGGGACC
81      V S L S H D T Q Q W G D V L P D G N G T

```

301  
 TACCAGACATGGGTGGCTACTCGGATCTCCCAGGGGGAGGAACAGAGATTCACCTGCTAT  
 101 Y Q T W V A T R I S Q G E E Q R F T C Y

361  
 ATGGAGCATAGTGGAAACCACTCAACACATCCTGTGCCATCTGGCAAGGTGCTGGTCCTG  
 121 M E H S G N H S T H P V P S G K V L V L

421  
 CAGAGTCACTGGCAGACATTTTCATGGATCAGGCGATATCATTAAGCTGCTGAACGAACAG  
 141 Q S H W Q T F H **G S G** D I I K L L N E Q

481  
 GTGAACAAGGAGATGCAGTCTAGTAACCTGTACATGAGCATGTCAAGCTGGTGTATACA  
 161 V N K E M Q S S N L Y M S M S S W C Y T

541  
 CACTCCCTGGACGGAGCCGGCCTGTTCTGTTTGATCAGCCGCTGAGGAATACGAACAT  
 181 H S L D G A G L F L F D H A A E E Y E H

601  
 GCTAAGAACTGATCATTTTCTGAATGAGAACAATGTGCCAGTCCAGCTGACTAGCATT  
 201 A K K L I I F L N E N N V P V Q L T S I

661  
 TCCGCACCCGAACACAAGTTCGAGGGCCTGACCCAGATCTTTCAGAAAGCCTACGAACAC  
 221 S A P E H K F E G L T Q I F Q K A Y E H

721  
 GAGCAGCATATCTCTGAAAGTATCAACAACATCGTGGACCACGCAATCAAGAGCAAAGAT  
 241 E Q H I S E S I N N I V D H A I K S K D

781  
 CATGCCACCTTCAACTTTCTGCAGTGGTACGTGGCCGAGCAGCACGAGGAAGAGGTCCTG  
 261 H A T F N F L Q W Y V A E Q H E E E V L

841  
 TTTAAGGACATTCTGGATAAAATCGAACTGATTGGCAATGAGAATCACGGGCTGTACCTG  
 281 F K D I L D K I E L I G N E N H G L Y L

901 GCAGATCAGTATGTCAAGGGCATCGCAAAGTCAAGGAAATCATGA (SEQ ID NO:  
 6)  
 301 A D Q Y V K G I A K S R K S \* (SEQ ID NO:  
 7)

SEQ DNAMAN: 945 pb;

Composición 254 A; 252 C; 241 G; 198 T; 0 OTRO

Porcentaje: 26.9% A; 26.7% C; 25.5% G; 21.0% T; 0.0% OTRO

Peso molecular (kDa): ADNss: 291.81 ADNds: 582.6

ORIGEN

1 ATGGTCCCCT GTACCCTGCT GCTGCTGCTG GCTGCTGCAC TGGCACCTAC  
 TCAGACTCGG

61 GCCCACCATC ATCACCATCA CTCAAAAAGT TACCCCTACG ATGTCCCCGA  
 CTACGCCAGG  
 121 ACCGTGCCCC CTATGGTGAA CGTCACACGC TCAGAAGCTA GCGAGGGCAA  
 TATCACCGTG  
 181 ACATGCCGAG CATCTGGGTT CTATCCTTGG AACATTACAC TGAGTTGGAG  
 GCAGGACGGG  
 241 GTGTCCCTGT CTCACGATAC TCAGCAGTGG GGCGACGTGC TGCCAGATGG  
 CAATGGGACC  
 301 TACCAGACAT GGGTGGCTAC TCGGATCTCC CAGGGGGAGG AACAGAGATT  
 CACCTGCTAT  
 361 ATGGAGCATA GTGGAAACCA CTCAACACAT CCTGTGCCAT CTGGCAAGGT  
 GCTGGTCTTG  
 421 CAGAGTCACT GGCAGACATT TCATGGATCA GGCGATATCA TTAAGCTGCT  
 GAACGAACAG  
 481 GTGAACAAGG AGATGCAGTC TAGTAACCTG TACATGAGCA TGTC AAGCTG  
 GTGTTATACA  
 541 CACTCCCTGG ACGGAGCCGG CCTGTTCCCTG TTTGATCACG CCGCTGAGGA  
 ATACGAACAT  
 601 GCTAAGAAAC TGATCATTTT CCTGAATGAG AACAAATGTGC CAGTCCAGCT  
 GACTAGCATT  
 661 TCCGCACCCG AACACAAGTT CGAGGGCCTG ACCCAGATCT TTCAGAAAGC  
 CTACGAACAC  
 721 GAGCAGCATA TCTCTGAAAG TATCAACAAC ATCGTGGACC ACGCAATCAA  
 GAGCAAAGAT  
 781 CATGCCACCT TCAACTTTCT GCAGTGGTAC GTGGCCGAGC AGCACGAGGA  
 AGAGGTCCTG  
 841 TTTAAGGACA TTCTGGATAA AATCGAACTG ATTGGCAATG AGAATCACGG  
 GCTGTACCTG  
 901 GCAGATCAGT ATGTCAAGGG CATCGCAAAG TCAAGGAAAT CATGA (SEQ ID NO:  
 8)

**Paso 1.** Amplificar plantilla para PCR 1 (péptido señal, 6 his, enlazador, HA, MICA alfa 3) de la construcción C1347 usando cebadores

Cebador directo# ferritina\_baculo\_SmaIfor

**5' AAAAAA CCGGGATGGTCCCCTGTACCCTGCTGCTGCTGC 3'** (SEQ ID NO: 9)

Cebador interno interno: # ferritina baculo\_IRev

**5' GTTCGTTTCAGCAGCTTAATGATATCGCCTGATCCATGAAATGCTGCCAG 3'** (SEQ ID NO: 10)

**Paso 2.** Amplificar plantilla para PCR 2 (ferritina) de C1347 usando Cebador directo interno: # ferritina baculo\_IF

**5' CTGGCAGACATTTTCATGGATCAGGCGATATCATTAAGCTGCTGAACGAAC 3'** (SEQ ID NO: 11)

Cebador inverso: # ferritina baculo\_BamHIRev

**5' AAAAAAGGATCCTCATGATTTCTTTGACTTTGCGATGCCCTTG 3'** (SEQ ID NO: 12)

**Paso 3: PCR de fusión usando cebadores**

# ferritina\_baculo\_SmaIfor

y

# ferritina baculo\_BamHIRev

Análisis de restricción en DNAMAN18

Metilación: dam-No dcm-No

Tamizado con 117 enzimas, 18 sitios encontrados

ApaI 1 GGGCC/C  
63

BclI 2 T/GATCA  
573 611

BglII 1 A/GATCT  
695

BsiI 2 C/TCGTG  
718 823

Bsp1407I 1 T/GTACA  
509

BspHI 1 T/CATGA  
940

BspMI 1 ACCTGCNNNN/ (SEQ ID NO: 13)  
361

Eam1105I 1 GACNNN/NNGTC (SEQ ID NO: 14)  
240

Eco56I 1 G/CCGGC  
556

EcoNI 1 CCTNN/NNNAGG (SEQ ID NO: 15)  
841

EcoRV 1 GAT/ATC  
456

NaeI 1 GCC/GGC  
558

NheI 1 G/CTAGC  
157

PstI 2 CTGCA/G  
422 803

PvuII 1 CAG/CTG  
648

Lista por orden del sitio

|       |          |     |          |     |       |     |
|-------|----------|-----|----------|-----|-------|-----|
| 63    | ApaI     | 456 | EcoRV    | 611 | BclI  | 803 |
| PstI  |          |     |          |     |       |     |
| 157   | NheI     | 509 | Bsp1407I | 648 | PvuII | 823 |
| BsiI  |          |     |          |     |       |     |
| 240   | Eam1105I | 556 | Eco56I   | 695 | BglII | 841 |
| EcoNI |          |     |          |     |       |     |
| 361   | BspMI    | 558 | NaeI     | 718 | BsiI  | 940 |
| BspHI |          |     |          |     |       |     |
| 422   | PstI     | 573 | BclI     |     |       |     |

Sin enzimas de corte

|         |          |             |          |              |         |
|---------|----------|-------------|----------|--------------|---------|
| AatII   | Acc65I   | AccIII      | AclI     | AflII        | AgeI    |
| AhaIII  | Alw44I   | AlwNI       | ApaBI    | ApaLI        | AscI    |
| Asp718I | AsuII    | AvrII       | BalI     | <b>BamHI</b> | BbeI    |
| BbvII   | BglI     | Bpu1102I    | Bsc91I   | BsmI         | BspMII  |
| BssHII  | BstD102I | BstEII      | BstXI    | Bsu36I       | ClaI    |
| Csp45I  | CspI     | CvnI        | DraI     | DraIII       | DrdI    |
| EagI    | Ecl136II | Eco31I      | Eco47III | Eco52I       | Eco57I  |
| Eco72I  | EcoICRI  | EcoRI       | EheI     | EspI         | FseI    |
| HindIII | HpaI     | I-PpoI      | KpnI     | MfeI         | Mlu113I |
| MluI    | MscI     | MstI        | MstII    | NarI         | NcoI    |
| NdeI    | NotI     | NruI        | NsiI     | PacI         | PflMI   |
| PinAI   | PmaCI    | PmeI        | PvuI     | RleAI        | SacI    |
| SacII   | SalI     | SapI        | SauI     | ScaI         | SciI    |
| SfiI    | SgrAI    | <b>SmaI</b> | SnaBI    | SpeI         | SphI    |
| SplI    | SpoI     | SrfI        | SspI     | SstI         | SstII   |
| StuI    | SunI     | SwaI        | Tth111I  | VspI         | XbaI    |
| XcmI    | XhoI     | XmaI        | XmaIII   | XmnI         | XorII   |

### Ferritina de H. Pylori

MLSKDIIKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIF  
 LNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFL  
 QWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS 181 (SEQ ID NO: 16)

La posición N19 cambia a Q (para eliminar el sitio de glicosilación N-enlazado), comienza en la posición 5 (subrayado)

### ferritina [Helicobacter pylori]

Secuencia de referencia de NCBI: WP\_000949190.1

Gráficas FASTA

Ir a:

LOCUS WP\_000949190 167 aa lineal BCT

16-MAY-2013

DEFINICIÓN ferritina [Helicobacter pylori].

ACCESO WP\_000949190

VERSIÓN WP\_000949190.1 GI:446871934

PALABRAS CLAVE RefSeq.

FUENTE Helicobacter pylori

ORGANISMO Helicobacter pylori

Bacteria; Proteobacteria; Epsilonproteobacteria;  
 Campylobacterales;

Helicobacteraceae; Helicobacter.

COMENTARIO REFSEQ: Este registro representa una secuencia de  
 proteína única, no redundante

que puede ser anotada en muchos genomas RefSeq diferentes  
 de la misma o diferente especie.

INTEGRIDAD: longitud completa.

CARACTERÍSTICAS Ubicación/Calificadores

fuerce 1..167

/organismo="Helicobacter pylori"

/db\_xref="taxon:210"

Proteína 1..167

```

                                /producto="ferritina"
                                /calculado_mol_wt=19183
Región                          3..158
                                /región_nombre="Nonheme_Ferritina"
                                /nota="nonheme-que contiene ferritinas; cd01055"
                                /db_xref="CDD:153113"
Región                          7..144
                                /región_nombre="Ferritina"
                                /nota="Dominio tipo ferritina; pfam00210"
                                /db_xref="CDD:249681"
Sitio                          orden(17,49..50,53,94,126,129..130)
                                /sitio_tipo="otro"
                                /nota="centro diiron ferroxidasa [unión de ion]"
                                /db_xref="CDD:153113"
ORIGEN
      1 mlskdiikll neqvnkemns snlymsmssw cythsldgag lflfdhaaee
yehakkliif
      61 lnennvpvql tsisapehkf egltqifqka yeheqhises innivdhaik
skdhatfnfl
      121 qwyvaeqhee evlfkdildk ielignenhg lyladqyvkg iaksrks (SEQ ID
NO: 17)

```

5

**EJEMPLO 11****Expresión de proteína MICA 002 desglucosilada en células de insecto****Propósito: Expresión de baculovirus de alfa 3 de MICA desglucosilada (\* 002: 01)**

Diseño general:

Péptido señal, péptido HA N-terminal, dominio alfa 3 de MICA (\*002:01), codón de interrupción

1 MVPCTLLLLL AAALAPTQTR ASKSY<sup>Y</sup>PDVP DYARTVPPMV QVTRSEASEG QITVTCRASG

péptido de señal, HA

61 FYPWNINLSW RQDGVSLSHD TQQWGDVLPD GNGTYQTWVA TRISQGEEQR FTCYMEHSGQ MICA  
alfa 3

121 HSTHPVPSGK VLVLQSHWQT FH\* interrupción (SEQ ID NO: 25)

**Estrategia: Clonar en el sitio pAcDB3 BglII-EcoRI**

SEQ DNAMAN1: 432 pb;

Composición 96 A; 125 C; 122 G; 89 T; 0 OTRO

Porcentaje: 22.2% A; 28.9% C; 28.2% G; 20.6% T; 0.0% OTRO

Peso molecular (kDa): ADNss: 133.37 ADNds: 266.4

ORIGEN

```

1      ATGGTCCCCT GTACCCTGCT GCTGCTGCTG GCTGCTGCAC TGGCACCTAC TCAGACTCGG
61     GCCTCAAAAA GTTACCCCTA CGATGTCCCC GACTACGCCA GGACCGTGCC CCCTATGGTG
121    CAGGTCACAC GCTCAGAAGC TAGCGAGGGC CAAATCACCG TGACATGCCG AGCATCTGGG
181    TTCTATCCTT GGAACATTAA CCTGAGTTGG AGGCAGGACG GGGTGTCCCT GTCTCACGAT
241    ACTCAGCAGT GGGGCGACGT GCTGCCAGAT GGCAATGGGA CCTACCAGAC ATGGGTGGCT
301    ACTCGGATCT CCCAGGGGGA GGAACAGAGA TTCACCTGCT ATATGGAGCA TAGTGGACAG
361    CACTCAACAC ATCCTGTGCC ATCTGGCAAG GTGCTGGTCC TGCAGAGTCA CTGGCAGACA
421    TTTCATTGA (SEQ ID NO: 18)

```

Traducción de DNAMAN1(1-432)  
 Código universal  
 Número de aminoácido total: 143, MW=15928  
 Max ORF: 1-429, 143 AA, MW=15928

```

1      ATGGTCCCCTGTACCCTGCTGCTGCTGCTGGCTGCTGCACTGGCACCTACTCAGACTCGG
1      M V P C T L L L L L A A A L A P T Q T R

61     GCCTCAAAAAGTTACCCCTACGATGTCCCCGACTACGCCAGGACCGTGCCCCCTATGGTG
21     A S K S Y P Y D V P D Y A R T V P P M V

121    CAGGTCACACGCTCAGAAGCTAGCGAGGGCCAAATCACCGTGACATGCCGAGCATCTGGG
41     Q V T R S E A S E G Q I T V T C R A S G

181    TTCTATCCTTGGAACATTAACCTGAGTTGGAGGCAGGACGGGGTGTCCCTGTCTCACGAT
61     F Y P W N I N L S W R Q D G V S L S H D

241    ACTCAGCAGTGGGGCGACGTGCTGCCAGATGGCAATGGGACCTACCAGACATGGGTGGCT
81     T Q Q W G D V L P D G N G T Y Q T W V A

301    ACTCGGATCTCCCAGGGGGAGGAACAGAGATTACCTGCTATATGGAGCATAGTGGACAG
101    T R I S Q G E E Q R F T C Y M E H S G Q

361    CACTCAACACATCCTGTGCCATCTGGCAAGGTGCTGGTCCTGCAGAGTCACTGGCAGACA
121    H S T H P V P S G K V L V L Q S H W Q T

421    TTTCATTGA (SEQ ID NO: 19)
141    F H * (SEQ ID NO: 20)

```

Análisis de restricción en DNAMAN1  
 Metilación: dam-No dcm-No  
 Tamizado con 117 enzimas, 5 sitios encontrados  
 BspMI 2 ACCTGCNNNN/ (SEQ ID NO: 21)  
 343 111

Eam1105I 1 GACNNN/NNGTC (SEQ ID NO: 22)  
 222

NheI 1 G/CTAGC  
 139

PstI 1 CTGCA/G  
 404

Lista por orden del sitio  
 111 BspMI 222 Eam1105I 343 BspMI 404 PstI  
 139 NheI

Sin enzimas de corte

|        |         |        |          |              |          |
|--------|---------|--------|----------|--------------|----------|
| AatII  | Acc65I  | AccIII | AclI     | AflIII       | AgeI     |
| AhaIII | Alw44I  | AlwNI  | ApaBI    | ApaI         | ApaLI    |
| AscI   | Asp718I | AsuII  | AvrII    | BalI         | BamHI    |
| BbeI   | BbvII   | BclI   | BglI     | <b>BglII</b> | Bpu1102I |
| Bsc91I | BsiI    | BsmI   | Bsp1407I | BspHI        | BspMII   |

|        |          |         |          |        |        |
|--------|----------|---------|----------|--------|--------|
| BssHII | BstD102I | BstEII  | BstXI    | Bsu36I | ClaI   |
| Csp45I | CspI     | CvnI    | DraI     | DraIII | DrdI   |
| EagI   | Ecl136II | Eco31I  | Eco47III | Eco52I | Eco56I |
| Eco57I | Eco72I   | EcoICRI | EcoNI    | EcoRI  | EcoRV  |
| EheI   | EspI     | FseI    | HindIII  | HpaI   | I-PpoI |
| KpnI   | MfeI     | Mlu113I | MluI     | MscI   | MstI   |
| MstII  | NaeI     | NarI    | NcoI     | NdeI   | NotI   |
| NruI   | NsiI     | PacI    | PflMI    | PinAI  | PmaCI  |
| PmeI   | PvuI     | PvuII   | RleAI    | SacI   | SacII  |
| SalI   | SapI     | SauI    | ScaI     | SciI   | SfiI   |
| SgrAI  | SmaI     | SnaBI   | SpeI     | SphI   | SplI   |
| SpoI   | SrfI     | SspI    | SstI     | SstII  | StuI   |
| SunI   | SwaI     | Tth111I | VspI     | XbaI   | XcmI   |
| XhoI   | XmaI     | XmaIII  | XmnI     | XorII  |        |

#### 4099: MICA002\_baculo\_BglIIfor

5' AAAAAAAGATCTATGGTCCCCTGTACCCTGCTGCTGCTGC 3' (SEQ ID NO: 23)

#### 4100: MICA002\_baculo\_EcoRIRev

5' AAAAAAGAATTC TCAATGAAATGTCTGCCAGTGACTCTGC 3' (SEQ ID NO: 24)

5

#### Otras Modalidades

Aunque la invención ha sido descrita en conjunción con la descripción detallada de la misma, la descripción precedente pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que es definida por el alcance de las reivindicaciones anexas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.