



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 473**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08152608 .9**

96 Fecha de presentación : **20.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1944318**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54

Título: **Citoquinas multifuncionales.**

30

Prioridad: **28.01.2004 US 539320 P**
21.07.2003 EP 03360086

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

73

Titular/es: **TRANSGENE S.A.**
boulevard Gonthier d'Andernach
Parc d'Innovation, CS80166
67405 Illkirch Graffenstaden Cédex, FR

72

Inventor/es: **Paul, Stéphane**

74

Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 359 473 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a una proteína de fusión nueva con la fórmula X-Y, en la que X representa IL-2 e Y representa IL-18.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión y a un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. La presente invención también da a conocer partículas virales infecciosas y células huésped que comprenden dicha molécula de ácido nucleico o dicho vector, así como un proceso para preparar dichas partículas virales infecciosas. La presente invención también da a conocer un método para preparar de manera recombinante dicha proteína de fusión. Finalmente, la presente invención también da a conocer una composición farmacéutica que comprende dicha proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico, un vector, partículas virales infecciosas y una célula huésped, así como la utilización terapéutica de los mismos.

La presente invención es útil, de manera particular, en el campo de la terapia génica y la inmunoterapia, especialmente para el tratamiento o la prevención de un conjunto de enfermedades, que incluyen cánceres y enfermedades infecciosas (infecciones por bacterias y virus).

De forma general, las respuestas inmunes del huésped se encuentran en dos categorías: no específicas (o innatas) y específicas (o adaptativas o adquiridas). La diferencia entre éstas es que una respuesta inmune específica es altamente específica para un antígeno concreto, mientras que una respuesta no específica no depende de la exposición repetida a un patógeno/antígeno determinado. Las redes que controlan el sistema inmune dependen de las proteínas secretadas (por ejemplo, citoquinas) para activar y desactivar las funciones de las células inmunes, así como para regular su proliferación y para controlar la magnitud de la respuesta inmune. De manera específica, dos tipos de linfocitos, células B y células T, se encuentran en el núcleo de la inmunidad específica. Después de la liberación por un antígeno, las células B se dividen y las células hija sintetizan y secretan moléculas de anticuerpo (inmunidad humoral). La activación de las células T implica el desarrollo de la inmunidad mediada por células, mediada entre otros por linfocitos T citotóxicos (CTL) que eliminan de manera específica células diana no portadoras de auto-antígenos (por ejemplo, células infectadas o tumorales). La activación de una respuesta inmune específica (o adaptativa) está orquestada por numerosas citoquinas. Particularmente importantes son las interleuquinas (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-15 e interferón gamma (IFN γ). Por otro lado, las respuestas no específicas (innatas) implican diferentes tipos de células inmunes, incluyendo células asesinas ("killer") naturales (NK), células T Asesinas Naturales (NKT), células dendríticas (DCs) y macrófagos, y están, entre otras, mediadas por la secreción de citoquinas, tales como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21. En realidad, sin embargo, la diferencia estricta entre las respuestas inmunes específica y no específica es algo arbitraria, ya que la eliminación de patógenos y tumores *in vivo* es probable que implique que ambos tipos de respuesta inmune actúan de manera conjunta. Además, a través de los mecanismos de señalización de las citoquinas, los efectores específicos pueden jugar un papel principal en la inducción y activación de efectores no específicos y viceversa. Por ejemplo, una propiedad sorprendente de las células NKT es su capacidad de producir rápidamente grandes cantidades de citoquinas en respuesta al acoplamiento de receptores de células T, sugiriendo que las células NKT activadas también pueden modular respuestas inmunes específicas. Para una discusión general de la respuesta inmune, células efectoras inmunes y mediadores inmunes, véase, por ejemplo, las ediciones más actualizadas de "Encyclopedia of Immunology" (Editada por Ivan Roitt y Peter Delves; Academic Press Limited) y "Fundamental Immunology" (por ejemplo, 2ª Edición, editada por W. Paul; Raven Press).

En general, se acepta que el cáncer es un proceso de múltiples etapas que resulta de una pérdida del control de la multiplicación celular. Existe un gran cúmulo de investigaciones que apoyan la implicación de antígenos asociados a tumores (TAA) en la aparición del fenotipo maligno. Estos antígenos incluyen productos de oncogenes (por ejemplo, p53, ras, neu, erb), productos génicos embrionarios reactivados (por ejemplo, P91A hallado en el mastocitoma P815), autoantígenos modificados (por ejemplo, MUC-1 hiperglicosilado), genes virales oncogénicos (por ejemplo, antígenos tempranos del virus del papiloma) y un conjunto de otros. Con respecto al mecanismo que actúa en el reconocimiento y la eliminación de células tumorales, se ha observado que los linfocitos T desempeñan un papel clave para conferir especificidad al rechazo del tumor. En particular, se identificaron los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ como células efectoras importantes para reconocer antígenos tumorales específicos. Los CTL pueden eliminar tumores sólo después de haber sido sensibilizados previamente para un antígeno tumoral y sólo cuando son presentados en la superficie celular por productos génicos de MHC de clase I. En muchos casos, la inducción de la respuesta antitumoral también depende de la presencia de células T CD4+. Además de estas células efectoras inmunes específicas, se han identificado funciones en el rechazo tumoral para las células NK y otras células efectoras no específicas, tales como NKT y macrófagos, que pueden lisar células tumorales de una manera que no es dependiente de antígeno y no está limitada a MHC.

A pesar del hecho de que la amplia mayoría de antígenos asociados a tumores son capaces de ser reconocidos como exógenos por el sistema inmune del paciente y la abundancia de mecanismos inmunes tumorocidas, la mayoría de cánceres no provocan respuestas inmunológicas suficientes para controlar el crecimiento de células malignas. Las células tumorales han desarrollado diversos mecanismos que les permiten escapar de la inmunidad del huésped debido a una reducción en la presentación de antígenos por las células tumorales o debido a una disminución generalizada en la inmunidad del paciente. Como la expresión de los determinantes de MHC de clase I en la superficie celular es esencial para el reconocimiento de antígenos exógenos por los CTL, la supresión o fracaso en la expresión de antígenos de MHC de clase I es uno de los mecanismos descritos utilizados por las células tumorales para eludir el

sistema inmune (Tanaka y otros, 1988, Ann. Rev. Immunol. 6, 359-380). Otro mecanismo de la anergia inmune implica la liberación de antígenos tumorales, evitando de este modo la interacción de las células inmunes con la propia célula diana tumoral. Además, los tumores pueden activar moléculas inmunosupresoras para disminuir la fuerza de las respuestas inmunes a los antígenos tumorales o para activar la apoptosis de células efectoras inmunes. Por ejemplo, IL-2 puede tener en algunas circunstancias, un papel crítico en el mantenimiento de la tolerancia periférica. Como resultado de su papel fundamental en la muerte celular inducida por activación (AICD), las células T generadas en respuesta a vacunas tumorales que contienen IL-2 pueden interpretar las células tumorales como propias y las células T reactivas al tumor pueden ser eliminadas por la apoptosis inducida por AICD (Lenardo, 1996, J. Exp. Med. 183, 721-724). Además, la IL-2 mantiene las células T reguladoras negativas CD4⁺CD25⁺ y se ha descrito que terminan la persistencia de células T de memoria CD8⁺ (Shevach, 2000, Ann. Rev. Immunol. 18, 423-449).

Un conjunto de estudios han descrito un papel crítico para las células CD4(+) específicas de tumor en el aumento de mecanismos efectores inmunoterapéuticos. Sin embargo, la estimulación crónica de dichas células T CD4(+) a menudo conduce a la regulación hacia arriba de tanto Fas como el ligando de Fas, y la coexpresión de estas moléculas puede dar lugar potencialmente a la muerte celular inducida por activación (AICD) y la posterior pérdida de la respuesta antitumoral. En cambio, la resistencia a AICD aumenta de manera significativa la actividad efectora de células T (Saff y otros, 2004, J. Immunol. 172, 6598-6606).

Un conjunto de estrategias previas han utilizado citoquinas para aumentar la inmunidad del huésped y, de este modo, para superar el estado inducido por el tumor de anergia inmune. Por ejemplo, la IL-2 humana (Proleuquina) es un agente terapéutico aprobado para el cáncer metastático en fase avanzada. Sin embargo, la administración sistémica de citoquinas es a menudo escasamente tolerada por los pacientes y está frecuentemente asociada con un conjunto de efectos secundarios que incluyen náuseas, dolor óseo y fiebre (Mire-Sluis, 1993, TIBTech vol. 11; Moore, 1991, Ann Rev Immunol. 9, 159-191). Estos problemas se exacerban por los niveles de dosis que se requieren para mantener las concentraciones eficaces en plasma. Se ha propuesto la liberación de citoquinas utilizando vectores virales y vehículos celulares para reducir la toxicidad sistémica. En los documentos WO 01/093898 y WO 01/068896 se han dado a conocer métodos para el tratamiento de enfermedades virales con IL-18 o para el tratamiento de alergias con una vacuna que comprende secuencias de una proteína de fusión de IL-18 y antígeno.

Se ha observado que las células tumorales modificadas genéticamente que liberan varias citoquinas aumentan la inmunogenicidad tumoral e inducen la regresión de tumores preexistentes. Se ha observado que la inmunización con células tumorales modificadas para secretar IL-2 (Karp y otros, 1993, J. Immunol. 150, 896-908), interferón alfa (IFN α) (Porgador y otros, 1993, J. Immunol. 150, 1458-1470) o GM-CSF (Dranoff y otros, 1993, PNAS 90, 3539-3543) aumenta la inmunogenicidad tumoral e induce la regresión de tumores preexistentes. En algunos casos, se ha generado una memoria inmunogénica para resistir a la posterior estimulación con células tumorales parentales no modificadas. Además, los tumores transducidos por citoquinas pueden atraer un exudato inflamatorio *in vivo* que, en general, da lugar a la destrucción del tumor en modelos de animales. Los animales experimentales y un pequeño conjunto de pacientes con neoplasmas establecidos tratados con las células tumorales secretadoras de citoquinas sobrevivieron durante un periodo más largo de tiempo, aunque en la mayoría de los casos, el crecimiento tumoral finalmente volvió a aparecer.

También se ha intentado la inyección directa en tumores sólidos de vectores que transportan genes que codifican un conjunto de citoquinas y quimioquinas a efectos de aumentar la presentación de epítopos de células T o para aumentar la activación de linfocitos T específicos de tumor. Muchas citoquinas, incluyendo el interferón gamma (IFN-g), IL-2 (Slos y otros, 2001, Cancer Gene Ther. 8, 321-332), IL-7 (Miller y otros, 2000, Human Gene Therapy 11(1), 53-65; Sharma y otros, 1996, Cancer Gene Therapy 3, 302-313), IL-12 (Melero y otros, 2001, Trends Immunol. 22, 113-115), IL-15 (Suzuki y otros, 2001, J. Leukoc. Biol. 69, 531-537; Kimura y otros, 1999, Eur. J. Immunol. 29, 1532-1542), IL-18 (Cao y otros, 1999, FASEB J. 13, 2195-2202; Wang y otros, 2001, Gene Therapy (Terapia Génica) 8, 542-550) e IL-21 (Ugai y otros, 2003 Cancer Gene Therapy 10, 187-192) han demostrado una actividad antitumoral significativa en ratones. Por ejemplo, la inyección intratumoral de células dendríticas transducidas con un adenovirus que expresa IL-7 conduce a respuestas inmunes sistémicas significativas y a potentes efectos antitumorales en modelos murinos de cáncer de pulmón (Miller y otros, 2000, Hum Gene Ther. 11, 53-65). El documento WO 02/102404 describe la utilización de una o más citoquinas aviares para estimular la respuesta inmune del ave a un antígeno.

De manera más reciente, muchos estudios con modelos de tumores tanto de ratón como humano han demostrado la importancia de combinaciones de citoquinas en el desarrollo de respuestas inmunes óptimas (véase, por ejemplo, Putzer y otros, 1997, Proc Natl Acad. Sci USA 94, 10889-10894; Melero y otros, 2001, Trends Immunol. 22, 113-115; Zhu y otros, 2001, Cancer Res. 61, 3725-3734; Wigginton y otros, 2002, Journal of Immunology 169, 4467-4474; Son y otros, 2001, Cancer Res. 61, 884-888; documento WO 03/035105). Por ejemplo, se ha observado que la combinación de IL-12 con la IL-18 que induce Th1 es útil para la estimulación de la respuesta inmune mediada por células (Hashimoto y otros, 1999, J. Immunol. 163, 583-589; Barbulescu y otros, 1998, J. Immunol. 160, 3642-3647). Se ha observado que IL-2 e IFN γ cooperan para inhibir el crecimiento de células tumorales (patente de Estados Unidos 5.082.658). De manera más reciente, se describió que IL-21 actuaba en sinergia con los efectos de IL-15 o IL-18 en el aumento de la producción de IFN γ en células NK y T humanas (Strengell y otros, 2003, J. Immunol., 170, 5464-5469). La combinación de IL-4 y GM-CSF es particularmente útil en la estimulación de DC (Palucka y otros, 1998, J. Immunol. 160, 4587-4595). En otros estudios, se encontró que la combinación de IL-3 e IL-11 presentaba un efecto sinérgico con IL-12 en la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas tempranas (Trinchieri y otros, 1994, Blood 84,

4008-4027). Graham y colaboradores promovieron la combinación de dos adenovirus, uno que codificaba IL-2 y el otro IL-12 (Addison y otros, 1998, Gene Ther. 5, 1400-1409). Observaron una regresión completa en más del 60% de los carcinomas mamarios establecidos y la inducción de una potente actividad antitumoral de CTL. Datos recientes muestran que la IL-15 también puede actuar de forma sinérgica con IL-12 después de la doble transfección de células cancerosas de pulmón humano (Di Carlo y otros, 2000, J. Immunol. 165, 3111-3118). Además, se ha identificado IL-18 como un potente inductor de IFN γ y, de manera destacada, regula hacia arriba la expresión de los receptores de IL-12 (Nakanishi y otros, 2001, Ann. Rev. Immunol. 19, 423-474). En un tumor descrito escasamente inmunogénico (MCA205), se observó una sinergia clara entre estas dos citoquinas con efectos antitumorales mediados principalmente por células NK.

Sin embargo, en muchos de estos estudios, se encontró que el nivel relativo de cada citoquina era muy importante. Por ejemplo, los estudios de sinergia entre IL-12 y otras citoquinas para la generación de respuestas antitumorales en ratones han mostrado resultados mezclados. Mientras que la adición de IL-12 en presencia de cantidades subóptimas de IL-12 condujo a una sinergia en la inducción, proliferación, actividad citolítica e inducción de IFN γ , se encontró que las combinaciones de IL-2 e IL-12 utilizando una dosis elevada de una citoquina eran antagonísticas (Perussia y otros, 1992, J Immunol. 149, 3495-3502; Mehrotra y otros, 1993, J. Immunol. 151, 2444-2452). En algunos modelos, una dosis no óptima de una citoquina con respecto a la otra condujo a una mayor citotoxicidad, mientras que en otros modelos, las combinaciones de IL-12 e IL-2 mostraron poca sinergia o ninguna (por ejemplo, Nastala y otros, 1994, J. Immunol. 153, 1697-1706). Una situación similar tiene lugar con combinaciones de IL-12 e IL-7. Estos resultados pueden reflejar la dificultad inherente de combinar dos citoquinas potencialmente sinérgicas *in vivo*, especialmente cuando existe la necesidad de mantener una proporción fija de actividades de dos componentes con propiedades farmacológicas diferentes, tales como una vida media circulante y una biodistribución diferentes.

Para reducir las dificultades inherentes a las combinaciones de citoquinas, una estrategia es fusionar las citoquinas. Las fusiones entre dos citoquinas ya se han propuesto en la literatura. Por ejemplo, el documento WO 01/10912 describe fusiones entre IL-12 y una segunda citoquina con una vida media corta a efectos de proporcionar un comportamiento farmacocinético más largo similar al de la propia IL-12. La fusión de IL-12 con cualquiera entre IL-2, factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o IL-4 está descrita de manera específica. Los documentos US 5.883.320 y WO 92/04455 dan a conocer fusiones entre IL-3 y una segunda citoquina, que se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades asociadas con un nivel disminuido de células hematopoyéticas. Se observó que la fusión entre IL-3 e IL-11 era útil para estimular la producción de megacariocitos y plaquetas. Drexler y otros (1998, Leuk Lymphoma 29, 119-129) describen la fusión de GM-CSF e IL-3. Finalmente, el documento US 6.261.550 prevé la fusión de G-CSF con una citoquina para aumentar la hematopoyesis, por ejemplo, para compensar el déficit hematopoyético resultante de la quimioterapia o terapia por radiación de pacientes con cáncer.

El desarrollo de moléculas eficaces contra tumores humanos ha sido un objetivo buscado desde hace tiempo que aún está por conseguir. A la luz de lo anterior, aún existe la necesidad de fusiones de citoquinas que provoquen una respuesta inmune y sean capaces de eludir la inmunosupresión tumoral.

Este problema técnico se soluciona mediante la disposición de las realizaciones tal como se definen en las reivindicaciones.

La presente invención da a conocer proteínas de fusión nuevas que son útiles para aumentar una respuesta inmune, especialmente una respuesta inmune específica junto con una no específica en un organismo huésped. La respuesta resultante es útil para invertir la inmunosupresión o los mecanismos de anergia inducidos por patógenos o células cancerosas. Estas proteínas de fusión o vectores que las expresan se pueden utilizar para proteger un animal o un ser humano contra un conjunto de condiciones patológicas clínicas, tales como infecciones agudas o crónicas o cánceres. La presente invención da a conocer proteínas de fusión que proporcionan una tasa elevada de rechazo tumoral después de la administración intratumoral de vectores adenovirales que las codifican en varios modelos animales, proporcionando pruebas de una inmunoestimulación significativa. Según la presente invención, estas proteínas de fusión o sus secuencias codificantes también se pueden utilizar como inmunoadyuvantes para tecnologías de vacunas (por ejemplo, en combinación con uno o más inmunógenos) o en combinación con estrategias con genes suicidas, en la prevención y el tratamiento del cáncer o enfermedades infecciosas en seres humanos y otros mamíferos.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer una proteína de fusión nueva con la fórmula:

X-Y,

en la que X representa IL-2 e

Y representa IL-18.

Tal como se utiliza en la presente invención a lo largo de toda la solicitud, los términos "un" y "una" se utilizan en el sentido de que significan "como mínimo uno o una", "como mínimo un primer o una primera", "uno o una o más" o "un conjunto" de los compuestos o etapas de referencia, a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye un conjunto de células, incluyendo una mezcla de las mismas.

El término “y/o”, cuando se utiliza en la presente invención, incluye el significado de “y”, “o” y “todas o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término”.

El término “aproximadamente”, tal como se utiliza en la presente invención, significa dentro del 20%, preferentemente dentro del 10%, y más preferentemente dentro del 5% de un valor o intervalo determinado.

5 Tal como se utiliza en la presente invención, cuando se utiliza para definir productos, composiciones y métodos, el término “que comprende” pretende significar que los productos, composiciones y métodos incluyen los componentes o etapas de referencia, pero sin excluir otros. “Que consiste esencialmente en” significará que excluye otros componentes o etapas de cualquier importancia esencial. De este modo, una composición que consiste esencialmente en los componentes mencionados no excluiría las trazas de contaminantes y los portadores farmacéuticamente aceptables. “Que consiste en” significará que excluye más que los elementos traza de otros componentes o etapas.

10 El término “polipéptido” o “proteína” se utilizan en la presente invención de manera indistinta para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud, preferentemente, como mínimo, de 50 residuos de aminoácidos. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede interrumpirse por no aminoácidos. El término también abarca un polímero de aminoácidos que ha sido modificado en uno o más residuos de aminoácidos mediante la sustitución o adición de grupos o mediante técnicas de modificación química conocidas en la técnica. Se incluyen en el alcance de la presente invención, por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro, la glicosilación, la lipidación, la hidroxilación, la yodación, la metilación, la acetilación, la acilación, la gamma carboxilación, la fosforilación, el procesamiento proteolítico, o cualquier otra manipulación, tal como la conjugación o unión con un grupo detectable (es decir, marcadores escintigráficos, radioactivos, fluorescentes, o marcadores colorantes, y similares). Entre los marcadores radioactivos adecuados se incluyen, pero sin estar limitados a los mismos, ^{99m}Tc, ¹²³I e ¹¹¹In. En el contexto de la presente invención, los términos “aminoácido” y “residuo” son sinónimos. Éstos abarcan aminoácidos naturales, no naturales y/o sintéticos, incluyendo isómeros ópticos D o L, aminoácidos modificados y análogos de aminoácidos.

25 El término “fusión” o “proteína de fusión” o “citoquina de fusión”, tal como se utilizan en la presente invención, se refiere a la combinación de secuencias de aminoácidos del primer polipéptido y del segundo polipéptido en una cadena polipeptídica, preferentemente por fusión en el marco de las correspondientes secuencias de nucleótidos codificantes. En la naturaleza, los grupos X e Y pueden existir normalmente en proteínas separadas, las cuales se juntan en la proteína de fusión de la presente invención. En la proteína de fusión de la presente invención, la secuencia codificante del primer polipéptido (X) se fusiona en el marco con la secuencia codificante del segundo polipéptido (Y), ya sea directamente o a través de un enlazador. Por “fusionado en el marco” se entiende que la expresión de las secuencias codificantes fusionadas da lugar a la proteína de fusión que comprende tanto el primer como el segundo polipéptido. Esto significa, por ejemplo, que no existe terminador traduccional entre los marcos de lectura de los polipéptidos X e Y. Aún cuando la fusión entre los grupos X e Y puede tener lugar internamente en cualquier sitio, el grupo Y se fusiona preferentemente a los extremos terminales COOH o NH₂ del grupo X (dando lugar a la fusión de la fórmula X-Y e Y-X, respectivamente). Tal como se utiliza en la presente invención, el término “directamente” se refiere a una fusión de los polipéptidos X e Y sin péptido enlazador entre los mismos (es decir, los codones que codifican el grupo X son contiguos a los codones que codifican el grupo Y). Además, la proteína de fusión también puede incluir elementos adicionales a parte de X, Y y un enlazador, tales como, una metionina iniciadora, un péptido señal y/o un propéptido. Las proteínas de fusión que consisten esencialmente en X e Y y, de manera opcional, un enlazador, son realizaciones preferentes en el contexto de la presente invención.

40 El término “polipéptido inmunoregulador”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido capaz de regular una respuesta inmune en un animal u organismo humano. “Que regula una respuesta inmune” se refiere a modular la actividad de células efectoras inmunes o moléculas mediadoras implicadas en una respuesta inmune. El término “regular” se puede referir a aumentar o reducir una respuesta inmune, con una especial preferencia por el aumento. Tal como se utiliza en la presente invención, el término “aumentar” se refiere a inducir la aparición y/o modular la magnitud y duración de la respuesta inmune que conduce a la activación, diferenciación, maduración y/o proliferación de una o más células efectoras inmunes y/o a la producción de mediadores inmunes apropiados, y/o a la mejora de la presentación de antígenos, y/o a la aparición de un beneficio clínico (por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral, regresión tumoral). La regulación de una respuesta inmune se puede determinar utilizando métodos conocidos en la técnica, así como métodos descritos en la presente invención.

50 La proteína de fusión de la presente invención “aumenta” una respuesta inmune cuando la respuesta inmune, ya sea específica o no específica, observada con la adición de la proteína de fusión es mayor o se intensifica de cualquier modo cuando se compara con la misma respuesta inmune medida sin su adición. Preferentemente, el aumento de la respuesta inmune proporcionada por la proteína de fusión de la presente invención conduce a la mejora de una condición patológica. La capacidad del polipéptido de fusión de la presente invención para aumentar la respuesta inmune se puede evaluar, ya sea *in vitro* o *in vivo*, utilizando un conjunto de ensayos que son estándar en la técnica. Para una descripción general de las técnicas disponibles para evaluar la aparición y activación de la respuesta inmune, ya sea específica o no específica, véase, por ejemplo, Coligan y otros (1992 y 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health; incorporado en la presente invención por referencia). El análisis y validación de las proteínas de fusión de la presente invención también se muestran en la sección de ejemplos

que se acompaña. Los análisis adecuados incluyen, sin limitación, la determinación del estado de activación para un tipo particular de células efectoras inmunes, la velocidad de proliferación de dichas células, la cuantificación de los marcadores de la superficie celular, la actividad lítica de las células efectoras inmunes hacia células tumorales o células diana apropiadas, la medición de los perfiles de expresión de citoquinas secretadas por las células efectoras activadas. Los métodos adecuados para proceder con la evaluación de la respuesta inmune son convencionales e incluyen, entre otros, ELISA, inmunofluorescencia, transferencia Western, inmunohistoquímica, histología, citometría de flujo (FACS). Por ejemplo, se puede determinar la proliferación de células T, por ejemplo, mediante un análisis clásico de captación de [³H]timidina. Como otro ejemplo, se puede medir la actividad lítica de células T citotóxicas, por ejemplo, utilizando un análisis de la liberación de ⁵¹Cr, con o sin la proteína de fusión. Las células efectoras inmunes intactas y activadas también se pueden discriminar mediante la identificación de marcadores específicos de la superficie celular. Por ejemplo, se pueden identificar las células T inmaduras o intactas por su expresión de la isoforma de peso molecular elevado de la molécula CD45 conocida como CD45RA. Las células T maduras expresan la isoforma de peso molecular bajo de CD45 conocida como CD45RO. La regulación hacia arriba de CD80, CD86 y MHCII-lab refleja la maduración de células dendríticas. La presencia de CD8 es un marcador de CTL activados. En la técnica se conocen otros marcadores informativos del tipo o estado de maduración/activación de estas células inmunes. De manera adecuada, la proteína de fusión candidata también se puede analizar en un modelo de animal apropiado para evaluar su actividad antitumoral, reflejando un aumento de la respuesta inmune. Por ejemplo, la proteína de fusión se puede administrar en modelos de animales con tumor y se evalúan de forma periódica el crecimiento tumoral y/o la tasa de supervivencia en comparación con un control. Además de los métodos *in vivo* para determinar la inhibición del tumor, se pueden utilizar un conjunto de métodos *in vitro* a efectos de predecir la inhibición tumoral *in vivo*. Entre los ejemplos representativos se incluyen la actividad citolítica antitumoral mediada por linfocitos determinada, por ejemplo, mediante un análisis de la liberación de ⁵¹Cr, la proliferación de linfocitos dependiente de tumor (Ioannides y otros, 1991, J. Immunol. 146, 1700-1707), la generación *in vitro* de anticuerpos específicos de tumores (Herlyn y otros, 1984, J. Immunol. Meth. 73, 157-167), la inhibición del crecimiento celular *in vitro* mediada por células (por ejemplo, CTL, células T auxiliares) o humorales (por ejemplo, anticuerpos) (Gazit y otros, 1992, Cancer immunol. Immunother. 35; 135-144) y la determinación de la frecuencia de precursores celulares (Vose, 1982, Int. J. Cancer 30, 135-142).

En una realización preferente, la proteína de fusión de la presente invención da a conocer un aumento de la respuesta inmune en comparación con la respuesta inmune correspondiente cuando no se añade dicha proteína de fusión, en un factor, como mínimo, de 2, más preferentemente en un factor, como mínimo, de 3.

Las proteínas de fusión comprendidas por la presente invención no están limitadas por la identidad concreta de X e Y, ni por el número de grupos X y/o Y utilizados en la proteína de fusión. Los polipéptidos X e Y son diferentes, es decir, heterólogos entre sí. La diferencia puede ser en términos de estructura (por ejemplo, por debajo del 40% de la identidad entre su secuencia de aminoácidos respectiva) y/o en términos de su respectiva actividad biológica (por ejemplo, X e Y están implicados en diferentes mecanismos del sistema inmune). Los grupos X e Y implicados en la proteína de fusión de la presente invención se pueden originar (obtener, aislar) de forma individual de un ser humano o animal (por ejemplo, de origen canino, aviar, bovino, murino, ovino, porcino, felino, simio, y similar). La proteína de fusión también puede comprender los grupos X e Y de diversos orígenes (por ejemplo, X de origen humano e Y de origen animal).

X e Y pueden incluir, de manera independiente, sin limitación, precursores, formas maduras, variantes de citoquinas.

Las proteínas de fusión de la presente invención son aquellas en las que X e Y son IL-2 e IL-18, respectivamente.

La IL-2 es una citoquina pleiotrópica que actúa en la inmunidad tanto específica como no específica. Después de más de 20 años de investigación, se ha establecido que la IL-2 es un potente factor de crecimiento y diferenciación para las células T. La IL-2 también estimula la actividad citolítica de las células NK (Caligiuri y otros, 1990, J. Exp. Med. 171, 1509-1526) y de las denominadas células asesinas activadas por linfocitos (LAK) (Pawelec y otros, 1999, Crit Rev Oncog. 10, 83-127). La IL-2 induce la secreción de otras citoquinas, incluyendo IFN-g (Trinchieri y otros, 1984, J. Exp. Med. 160, 1147-1169). La IL-2 también muestra una fuerte actividad del factor de crecimiento de células B y puede estimular las células del linaje de los monocitos. La IL-2 parece ser producida exclusivamente por linfocitos T activados por antígenos, incluyendo tanto las células T CD4+ como las células T CD8+. La IL-2 media sus actividades biológicas mediante la unión a receptores de IL-2 (IL-2R), que se expresan de manera transitoria en células T activadas por antígeno y de manera continua por células NK. La proteína IL-2 humana madura consiste en 133 aminoácidos (Taniguchi y otros, 1983, Nature 302, 305-310). Se sintetiza como un precursor que contiene 153 aminoácidos con una secuencia líder hidrofóbica de 20 residuos (péptido señal) que se separa para producir la proteína madura antes o durante la secreción. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de IL-2 de 31 especies son actualmente bien conocidas. Por ejemplo, la secuencia de la proteína IL-2 humana en el Banco de Genes NCBI bajo el número de acceso P01585. Los números de acceso del Banco de Genes NM008366 y NM000586 describen las secuencias de genes de IL-2 de ratón y humana, respectivamente.

La IL-18 es una citoquina de Th1 descubierta recientemente que se describió que presentaba funciones inmunoreguladoras significativas tanto en células T como en células NK (Okamura y otros, 1995, Nature 378, 88-91). En particular, la IL-18 aumenta la proliferación de células T, aumenta la actividad citotóxica de células NK,

5 induce la secreción de GM-CSF tanto de células NK como células T y actúa de forma sinérgica con IL-12 en términos de producción de IFN-g (Okamura y otros, 1998, Curr Opin Immunol. 10, 259-264). La IL-18 se sintetiza como una molécula precursora biológicamente inactiva (pro-IL-18). Para generar la forma activa de IL-18, la prosequencia necesita ser separada por la proteasa de cisteína intracelular, IL-1 beta que convierte la enzima ICE, en el sitio de procesamiento Asp-X. La IL-18 puede inhibir el crecimiento tumoral en algunos sistemas tumorales murinos, pero no se ha demostrado la regresión de tumores establecidos por la terapia génica con IL-18 sola (Micallef y otros, 1997, Cancer Immunol Immunother. 43, 361-367, Osaki y otros, 1998, J. Immunol. 160, 1742-1749; Osaki y otros, 1999, Gene Ther. 6, 808-815; Hashimoto y otros, 1999, J. Immunol. 163, 583-589). Las secuencias de ADN y proteína de la molécula de IL-18 están publicadas (véase, por ejemplo, Okamura y otros, 1995, Nature 378, 88-91; Ushio y otros, 1996, J. Immunol., 156, 4274-4279; números de acceso del Banco de Genes NM008360 y NM001562 que describen las secuencias de nucleótidos de IL-18 de ratón y humana, respectivamente, y NP_001553 para la proteína IL-18 humana, así como los mutantes de IL-18 (véase el documento WO 02/101049).

15 En el contexto de la presente invención, los grupos X e Y utilizados en las proteínas de fusión de la presente invención se pueden obtener (aislar o derivar) de cualquier especie. Son preferentes de manera particular fusiones que implican la forma nativa o una forma modificada biológicamente activa de las citoquinas humanas.

La conformación de la fusión puede ser importante para alcanzar la actividad óptima de la proteína de fusión de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención da a conocer proteínas de fusión que comprenden, o de manera alternativa, consisten esencialmente en, o de manera alternativa, consisten en una proteína de fusión que:

20 tiene la fórmula X-Y, en la que X es IL-2 e Y es IL-18 (es decir, en la que IL-18 está fusionada al extremo COOH terminal de IL-2, denominándose dicha proteína de fusión IL-2/IL-18).

25 Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención abarca proteínas de fusión que implican formas pre-procesadas de longitud completa, así como formas procesadas maduras, fragmentos de las mismas y variantes de cada uno o ambos grupos X e Y, incluyendo variantes alélicas, así como variantes no naturales. Además de las variantes alélicas naturales de los grupos X y/o Y que pueden existir en la población, el experto en la materia entenderá adicionalmente que se pueden introducir cambios (es decir, una o más delecciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos) mediante mutación utilizando técnicas clásicas o recombinantes para realizar una mutagénesis aleatoria o dirigida. Una variante adecuada para utilizar en la presente invención tiene preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de homología elevado con la secuencia de aminoácidos de la citoquina nativa correspondiente. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la citoquina variante para utilizar en la proteína de fusión es, como mínimo, el 70%, como mínimo, aproximadamente el 75%, como mínimo, aproximadamente el 80%, como mínimo, aproximadamente el 90%, preferentemente, como mínimo, aproximadamente el 95%, más preferentemente, como mínimo, aproximadamente el 97%, e incluso más preferentemente, como mínimo, aproximadamente el 99%, idéntica con la secuencia nativa correspondiente.

35 El porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos se puede determinar utilizando métodos estándar conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, para determinar el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima. A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Se pueden introducir espacios en una o ambas secuencias de aminoácidos para la alineación óptima y se pueden descartar las secuencias no homólogas con fines de comparación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las secuencias son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios que se necesitan introducir para una alineación óptima y la longitud de cada espacio. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad y similitud entre dos secuencias se puede llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático (por ejemplo, Computational Molecular Biology (Biología Molecular por Ordenador), 1988, Ed Lesk AM, Oxford University Press, Nueva York; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Biocomputación: Informática y Proyectos del Genoma), 1993, Ed Smith D.W., Academic Press, Nueva York; Computer Analysis of Sequence Data (Análisis por Ordenador de los Datos de las Secuencias), 1994, Eds Griffin A.M. y Griffin H.G., Human Press, Nueva Jersey; Sequence Analysis Primer (Manual de Análisis de Secuencia), 1991, Eds Griskov y Deveraux J., Stockton Press, Nueva York). Además, existen varios programas informáticos disponibles para determinar el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos y entre las secuencias de ácidos nucleicos, tales como el programa GCG.TM. (disponible en Genetics Computer Group, Madison, Wis.), el programa DNAsis.TM. (disponible en Hitachi Software, San Bruno, California) o el programa MacVector.TM. (disponible en la Eastman Kodak Company, New Haven, Conn.).

55 Las variantes adecuadas de los grupos X y/o Y para la utilización en la presente invención son biológicamente activas y mantienen, como mínimo, una de las actividades descritas en la presente invención en relación con la citoquina nativa correspondiente. Preferentemente, se conserva el efecto terapéutico (por ejemplo, actividad antitumoral, evitar la anergia inmune inducida por tumor), aunque una función determinada de la citoquina o citoquinas nativas puede quedar afectada positiva o negativamente en cierto grado, por ejemplo, con variantes que muestran una citotoxicidad reducida o una mayor actividad biológica. Se pueden identificar los aminoácidos que son esenciales para una función determinada mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mediante mutagénesis dirigida de sitio.

También se pueden determinar los aminoácidos que son críticos para la unión a un compañero/sustrato (por ejemplo, un receptor) mediante un análisis estructural, tal como cristalización, resonancia magnética nuclear y/o marcaje por fotoafinidad. La variante resultante se puede analizar por su actividad biológica en pruebas, tales como las descritas anteriormente.

5 Por ejemplo, en un tipo de variantes funcionales, se sustituyen de manera conservativa uno o más residuos de aminoácidos. Una "sustitución conservativa de aminoácido" es aquella en la que el residuo de aminoácido en el polipéptido nativo es sustituido por un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares (véase, por ejemplo, la matriz de las figuras 84 y 85 del Atlas of Protein Sequence and Structure (Atlas de la Secuencia y Estructura de Proteínas), 1978, Vol. 5, Ed. M.O. Dayhoff, National Medical Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.). Habitualmente, las sustituciones se consideran como conservativas cuando la sustitución, de uno por el otro, es entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; los residuos hidroxilo Ser y Thr; los residuos ácidos Asp y Glu; los residuos amida Asn y Gln; los residuos básicos Lys y Arg; o los residuos aromáticos Phe y Tyr. De manera alternativa, en otra realización, se pueden introducir mutaciones de manera aleatoria a lo largo de toda la secuencia codificante de la citoquina o de parte de la misma, tal como mediante mutagénesis por saturación, y el mutante resultante se puede cribar por su actividad biológica tal como se describe en la presente invención para identificar mutantes que mantienen, como mínimo, la actividad terapéutica.

20 Según la presente invención, son particularmente importantes las variantes de IL-2 que muestran una citotoxicidad reducida en comparación con la IL-2 nativa correspondiente. Entre las variantes de IL-2 adecuadas se incluyen, sin limitación, las descritas en la patente europea EP 673257 y el documento US 5.229.109 que presentan una sustitución de aminoácido en la hélice alfa B formada por los residuos 33-46 de la IL-2 humana. Entre los ejemplos específicos de variantes de IL-2 de toxicidad baja se incluyen la variante F42K que presenta el residuo de fenilalanina en la posición 42 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de lisina, o la variante R38A que presenta el residuo de arginina en la posición 38 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de alanina. Además, las variantes de IL-2 adecuadas para utilizar en la presente invención también incluyen las descritas en el documento WO 99/60128 y por Shanafelt y otros (2000, Nat Biotech 18, 1197-1202).

30 Entre los ejemplos específicos se incluyen la variante D20I que presenta el ácido aspártico en la posición 20 de la IL-2 nativa sustituida por un residuo de isoleucina, la variante N88G que presenta la asparagina en la posición 88 de la IL-2 nativa sustituida por un residuo de glicina, la variante N88R que presenta la asparagina en la posición 88 de la IL-2 nativa sustituida por un residuo de arginina y la variante Q126M que presenta la glutamina en la posición 126 de la IL-2 nativa sustituida por un residuo de metionina o cualquier combinación de la misma. El término "en la posición", tal como se utiliza en la presente invención, abarca el significado de que la variante de citoquina respectiva es mutada en el sitio correspondiente con la posición en la citoquina nativa respectivamente citada.

35 En el contexto de la presente invención, son particularmente importantes las variantes de IL-18 que muestran una mayor actividad biológica en comparación con la IL-18 nativa correspondiente. Entre las variantes de IL-18 adecuadas se incluyen, sin limitación, las descritas por Kim y otros (2002, J. Biol. Chem. 277, 10998-11003) y Kim y otros (2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3304-3309, y, de manera más particular, la variante E42A que presenta el residuo de ácido glutámico en la posición 42 de la IL-18 nativa sustituido por un residuo de alanina o la variante K89A que presenta el residuo de lisina en la posición 89 de la IL-18 nativa sustituido por un residuo de alanina o una variante que combina ambas sustituciones. De manera preferente, las proteínas de fusión que comprenden IL-18 de la presente invención implican una IL-18 mutada que presenta la lisina en la posición 89 de la IL-18 nativa sustituida por un residuo de alanina (K89A).

45 Además, tal como se ha mencionado anteriormente, el término IL-18, tal como se utiliza en la presente invención, comprende proIL-18 e IL-18 madura. Según una realización preferente, el polipéptido IL-18 utilizado en la presente invención es una proIL-18 (es decir, que comprende su prosequencia endógena), especialmente cuando se fusiona al extremo NH₂ terminal de la otra citoquina compañera. Sin embargo, también se puede prever la utilización de un grupo IL-18 (por ejemplo, IL-18 madura) que comprende una prosequencia heteróloga (con respecto a la IL-18). Según otra realización, el polipéptido IL-18 utilizado en la presente invención carece de su prosequencia, de manera especial cuando se fusiona al extremo COOH terminal de la otra citoquina compañera.

50 Aunque los grupos X e Y se pueden fusionar directamente en la proteína de fusión de la presente invención, sin embargo, es preferente utilizar un péptido enlazador para unir X e Y. El objetivo del enlazador es permitir la formación, el plegamiento y/o funcionamiento correctos de cada uno de los grupos X e Y. Deben ser suficientemente flexibles y suficientemente largos para conseguir este objetivo. Preferentemente, se puede elegir la secuencia codificante del enlazador, de manera que estimula la interrupción traduccional y, por tanto, el plegamiento independiente de los grupos X e Y. Un experto en la materia será capaz de diseñar enlazadores adecuados según la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada por la forma, tamaño o número de secuencias del enlazador utilizadas. Se pueden insertar entre X e Y múltiples copias de la secuencia del enlazador de elección. El único requisito para la secuencia del enlazador es que funcionalmente no interfiera de manera adversa con el plegamiento y/o el funcionamiento de los grupos individuales de la proteína de fusión. Por ejemplo, un enlazador adecuado tiene de 5 a 60 aminoácidos de largo y puede comprender aminoácidos, tales como glicina, serina, treonina, asparagina, alanina y prolina (véase, por ejemplo, Wiederrecht y otros, 1988, Cell 54, 841; Dekker y otros, 1993, Nature 362, 852; Sturm y

otros, 1988, Genes and Dev. 2, 1582; Aumailly y otros, 1990 FEBS Lett. 262, 82). En el contexto de la presente invención son preferentes repeticiones que comprendan residuos de serina y glicina. Un ejemplo específico de enlazadores adecuados consiste en dos o tres o más (por ejemplo, hasta ocho) copias de la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (GGGS). Será evidente que la presente invención no se limita a la utilización de este enlazador en particular.

La presente invención incluye además proteínas de fusión que comprenden, o de manera alternativa, consisten esencialmente en, o de manera alternativa, consisten en una secuencia de aminoácidos que es idéntica en, como mínimo, el 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o incluso mejor idéntica en el 100% con las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEC ID No: 8 a 15.

La secuencia indicada en SEC ID No: 8 corresponde a la fusión entre la IL-2 humana y la IL-18 humana (pro-IL-18), extendiéndose la IL-2 humana desde el residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 153, extendiéndose el péptido enlazador desde el residuo de aminoácido 154 hasta el residuo de aminoácido 168, y extendiéndose la pro-IL-18 humana desde el residuo de aminoácido 169 hasta el residuo de aminoácido 361. La secuencia indicada en la SEC ID No: 9 corresponde a la fusión entre la IL-2 humana y la variante K89A de la pro-IL-18 humana, extendiéndose la IL-2 humana desde el residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 153, extendiéndose el péptido enlazador desde el residuo de aminoácido 154 hasta el residuo de aminoácido 168, y extendiéndose la variante de la pro-IL-18 humana desde el residuo de aminoácido 169 hasta el residuo de aminoácido 361, siendo el residuo de aminoácido 257 una alanina en lugar de una lisina en la IL-18 nativa. La secuencia indicada en la SEC ID No: 10 corresponde a la fusión entre la IL-2 humana y la IL-18 madura humana, extendiéndose la IL-2 humana desde el residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 153, extendiéndose el péptido enlazador desde el residuo de aminoácido 154 hasta el residuo de aminoácido 168 y extendiéndose la IL-18 madura humana desde el residuo de aminoácido 169 hasta el residuo de aminoácido 325. La secuencia indicada en la SEC ID No: 11 corresponde a la fusión entre la IL-2 humana y la variante K89A de la IL-18 madura humana, extendiéndose la IL-2 humana desde el residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 153, extendiéndose el péptido enlazador desde el residuo de aminoácido 154 hasta el residuo de aminoácido 168, y extendiéndose la variante de la IL-18 madura humana desde el residuo de aminoácido 169 hasta el residuo de aminoácido 325, siendo el residuo de aminoácido 221 una alanina en lugar de una lisina en la IL-18 nativa. La secuencia indicada en la SEC ID No: 12 corresponde a la fusión entre la IL-2 murina y la pro-IL-18 murina, extendiéndose la IL-2 murina desde el residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 169, extendiéndose el péptido enlazador desde el residuo de aminoácido 170 hasta el residuo de aminoácido 179 y extendiéndose la pro-IL-18 murina desde el residuo de aminoácido 180 hasta el residuo de aminoácido 371. La secuencia indicada en la SEC ID No: 13 corresponde a la fusión entre la IL-2 murina y la variante K89A de la IL-18 murina, extendiéndose la IL-2 murina desde el residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 169, extendiéndose el péptido enlazador desde el residuo de aminoácido 170 hasta el residuo de aminoácido 179, y extendiéndose la variante de la IL-18 murina desde el residuo de aminoácido 180 hasta el residuo de aminoácido 371, siendo el residuo de aminoácido 266 una alanina en lugar de una lisina en la IL-18 nativa. La secuencia indicada en la SEC ID No: 14 corresponde a la fusión entre la IL-2 murina y la IL-18 madura murina, extendiéndose la IL-2 murina desde el residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 169, extendiéndose el péptido enlazador desde el residuo de aminoácido 170 hasta el residuo de aminoácido 179, y extendiéndose la IL-18 madura murina desde el residuo de aminoácido 180 hasta el residuo de aminoácido 336. La secuencia indicada en la SEC ID No: 15 corresponde a la fusión entre la IL-2 murina y la variante K89A de la IL-18 madura murina, extendiéndose la IL-2 murina desde el residuo de aminoácido 1 hasta el residuo de aminoácido 169, extendiéndose el péptido enlazador desde el residuo de aminoácido 170 hasta el residuo de aminoácido 179, y extendiéndose la variante de la IL-18 madura murina desde el residuo de aminoácido 180 hasta el residuo de aminoácido 336, siendo el residuo de aminoácido 231 una alanina en lugar de una lisina en la IL-18 nativa.

En el contexto de la presente invención, una proteína "consiste en" una secuencia de aminoácidos cuando la proteína no contiene algún aminoácido no indicado en la secuencia de aminoácidos citada. Una proteína "consiste esencialmente en" una secuencia de aminoácidos cuando dicha secuencia de aminoácidos se encuentra presente junto con sólo unos pocos residuos de aminoácidos adicionales, habitualmente desde 1 a aproximadamente 50 residuos adicionales, más o menos. Una proteína "comprende" una secuencia de aminoácidos cuando la secuencia de aminoácidos es, como mínimo, parte de la secuencia de aminoácidos final (es decir, madura) de la proteína. Dicha proteína puede tener desde unos pocos hasta varios cientos de residuos de aminoácidos adicionales. Dichos residuos de aminoácidos adicionales pueden estar asociados de forma natural con cada uno o ambos grupos contenidos en las secuencias de aminoácidos/péptido de fusión o heterólogas (heterólogas con respecto a los grupos respectivos). Dichos residuos de aminoácidos adicionales pueden jugar un papel en el procesamiento de la proteína de fusión desde un precursor hasta una forma madura, pueden facilitar el tráfico de proteínas, prolongar o acortar la vida media de la proteína o facilitar la manipulación de la proteína de fusión para el análisis o producción, entre otras cosas. Preferentemente, las proteínas de fusión de la presente invención comprenden un péptido señal en el extremo NH₂ terminal a efectos de inducir la secreción en la célula u organismo huésped. Por ejemplo, se puede utilizar el péptido señal endógeno (es decir, presente de forma natural en la citoquina presente en el extremo NH₂ terminal de dicha fusión), o de forma alternativa, se puede añadir una secuencia de péptido señal heteróloga adecuada (con respecto a la citoquina en cuestión) al grupo citoquina presente en el extremo NH₂ terminal de la fusión o se puede insertar en sustitución de la endógena.

Los péptidos señal heterólogos adecuados incluyen, sin limitación, los péptidos señal de IL-2 y péptido

señal de inmunoglobulinas (Ig), tales como el péptido señal de la cadena ligera Kappa de una IgG de ratón (Meazza y otros, 2000, Int. J. Cancer 87, 574; Susuki y otros, 2001, J. Leukoc. Biol. 69, 531). Se da a conocer un ejemplo ilustrativo de esta realización mediante la proteína de fusión indicada en la SEC ID No: 5. De manera alternativa, también es posible utilizar el péptido señal de IL-15 endógeno o la forma corta o larga del mismo (Kuryus y otros, 2000, J. Biol. Chem. 275, 30653). Además, la proteína de fusión también se puede fusionar a un péptido etiqueta, por ejemplo, un péptido que facilita la identificación y/o purificación.

En el contexto de la presente invención, las proteínas de fusión de la presente invención pueden comprender grupos de citoquinas de cualquier origen, es decir, cualquier fuente humana o animal (incluyendo canina, aviar, bovina, murina, ovina, felina, porcina, etc.). Aunque las proteínas de fusión "quiméricas" también están comprendidas por la presente invención (por ejemplo, un grupo citoquina de origen humano y el otro de una fuente animal), es preferente que cada grupo tenga el mismo origen (por ejemplo, ambos humanos).

Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden producir mediante técnicas estándar. Las secuencias de polipéptidos y ADN para cada una de las citoquinas implicadas en la proteína de fusión de la presente invención están publicadas en el sector, así como los métodos para obtener la expresión de las mismas a través de técnicas sintéticas recombinantes o químicas. En otra realización, se puede sintetizar una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión mediante técnicas convencionales, incluyendo los sintetizadores de ADN automáticos. A continuación, se puede construir la secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión en un vector y se puede unir operativamente a una región reguladora capaz de controlar la expresión de la proteína de fusión en una célula u organismo huésped. Las técnicas para clonar las secuencias de ADN, por ejemplo, en vectores virales o plásmidos son conocidas para los expertos en la materia (Sambrook y otros, 2001, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Clonación Molecular. Un Manual de Laboratorio), Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY). La proteína de fusión de la presente invención se puede purificar a partir de células que han sido transformadas para expresarlas tal como se describe a continuación.

La proteína de fusión de la presente invención se puede caracterizar por tener la actividad habitual, como mínimo, de uno de los grupos X e Y que forman la fusión o se puede caracterizar además por tener una actividad biológica superior que simplemente las funciones aditivas de X e Y. Este aumento de la actividad proporciona efectos terapéuticos aumentados, permitiendo de este modo reducir los regímenes de dosificación, mejorar la complacencia y la terapia de mantenimiento, reducir las situaciones de emergencia y mejorar la calidad de vida. En ciertos casos, la molécula de fusión de la presente invención también puede proporcionar de forma inesperada una actividad diferente de la esperada por la presencia de X o Y. Por ejemplo, una actividad inesperada específica destacada en relación con la presente invención es la capacidad de las fusiones IL-2/IL-18 (IL-2/proIL-18 o IL-2/IL-18 madura) de activar la maduración de células dendríticas, por ejemplo, con el objetivo de aumentar una respuesta inmune no específica contra antígenos tumorales o virales. Otra actividad descubierta para la fusión IL-2/IL-18 (IL-2/proIL-18 o IL-2/IL-18 madura) es activar células NKT, por ejemplo, con el objetivo de aumentar una respuesta inmune no específica contra antígenos tumorales o virales. Otro efecto inesperado descubierto en relación con la presente invención es la citotoxicidad limitada (actividad AICD) proporcionada por las fusiones IL-2/IL-18 (IL-2/proIL-18 o IL-2/IL-18 madura) en comparación con después de la administración de la citoquina o citoquinas individuales en un organismo determinado, que se puede utilizar, por ejemplo, para reducir los efectos secundarios citotóxicos.

También se incluyen en el alcance de la presente invención fragmentos de péptidos nuevos de las proteínas de fusión y, de manera especial, los mencionados en cualquiera de las SEC ID No: 8 a 15. Tal como se utiliza en la presente invención, un fragmento comprende, como mínimo, 8, 15, 20, 50 o más residuos de aminoácidos contiguos de las proteínas de fusión dadas a conocer en la presente invención. Dichos fragmentos se pueden elegir en base a su capacidad de mantener una o más actividades terapéuticas y/o biológicas de la proteína de fusión o se podrían elegir por su capacidad de realizar una función, por ejemplo, unirse a un sustrato o actuar como inmunógeno. Los fragmentos de péptido adecuados son habitualmente aquellos que comprenden un dominio o motivo de la proteína de fusión que contiene nuevas estructuras inmunogénicas. Los sitios inmunogénicos predichos son fácilmente identificables mediante programas informáticos conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la materia. Son particularmente importantes los fragmentos de péptidos que se solapan con los sitios de fusión entre los grupos X e Y. Los fragmentos de péptidos de la proteína de fusión de la presente invención también se pueden sintetizar utilizando métodos de síntesis de proteínas conocidos.

La presente invención también da a conocer una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, el término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan de manera indistinta y definen un polímero de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean moléculas de desoxirribonucleótidos (ADN) (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ribonucleótidos (ARN) (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos (véase, los documentos US 5.525.711, US 4.711.955 o EPA 302175, como ejemplos de análogos de nucleótidos). Si están presentes, las modificaciones en la estructura de nucleótidos se pueden realizar antes o después del ensamblamiento del polímero. La secuencia de nucleótidos también puede estar interrumpida por elementos que no son nucleótidos. La molécula de ácido nucleico se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. El ácido nucleico, especialmente ADN, puede ser de doble cadena o cadena simple, pero

preferentemente es ADN de doble cadena. Los ácidos nucleicos de cadena simple pueden ser la cadena codificante (cadena de sentido) o la cadena no codificante (cadena antisentido).

Entre las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se incluyen, pero sin limitarse a éstas, la secuencia que codifica la proteína de fusión sola, pero puede comprender secuencias no codificantes adicionales, por ejemplo, intrones y secuencias 5' y 3' no codificantes que juegan un papel en la transcripción, procesamiento del ARNm (incluyendo corte y empalme ("splicing") y señales de poliadenilación), unión a ribosoma y estabilidad de ARNm. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ó 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' terminales) o están presentes en el ADN genómico que codifica los grupos X y/o Y.

Según una realización preferente, la presente invención da a conocer moléculas de ácido nucleico que comprenden, o de forma alternativa, consisten esencialmente en, o de forma alternativa, consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica toda una secuencia de aminoácidos o parte de la misma que codifica una proteína de fusión que es, como mínimo, aproximadamente el 70%, como mínimo, aproximadamente el 75%, como mínimo, aproximadamente el 80%, como mínimo, aproximadamente el 90%, como mínimo, aproximadamente el 95%, preferentemente, como mínimo, aproximadamente el 97%, más preferentemente, como mínimo, aproximadamente el 99%, homóloga o incluso más preferentemente el 100% homóloga con cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID NO: 8 a 15.

En otra realización, una molécula de ácido nucleico de la presente invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión mostrada en cualquiera de la SEC ID NO: 8 a 15. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la presente descripción es aquella que es suficientemente complementaria, de manera que se puede hibridar a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión bajo condiciones astringentes, formando de este modo una cadena doble estable. Dichas condiciones astringentes son conocidas por los expertos en la materia. Un ejemplo preferente, no limitante, de condiciones de hibridación astringentes es la hibridación en 6 veces cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2 veces SSC, SDS al 0,1% a 50-65°C. En una realización, la presente invención se refiere a ácido nucleico antisentido a las moléculas de ácido nucleico de la presente invención. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a la cadena codificante completa, o a sólo una parte de la misma.

En aún otra realización, la presente invención comprende variantes de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, por ejemplo, las variantes codificantes de las proteínas de fusión que se describen anteriormente. La variación o variaciones comprendidas por la presente invención se pueden crear mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida de sitio y mutagénesis mediada por PCR. Después de la mutagénesis, la molécula de ácido nucleico variante se puede expresar de manera recombinante tal como se describe en la presente invención y se puede determinar la actividad de la proteína resultante utilizando, por ejemplo, las pruebas descritas en la presente invención. De forma alternativa, la molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede alterar para proporcionar la utilización de codones preferentes para una célula huésped específica (por ejemplo, E. coli; Wada y otros, 1992, Nucleic Acid Res. 20. 2111-2118). La presente invención comprende además moléculas de ácido nucleico que se diferencian debido a la degeneración del código genético y, de este modo, codifican, por ejemplo, la misma proteína de fusión que cualquiera de las mostradas en las SEC ID No: 8 a 15.

Otra realización de la presente invención se refiere a fragmentos de la molécula de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, fragmentos generados por endonucleasa de restricción y por PCR. Dichos fragmentos se pueden utilizar como sondas, cebadores o fragmentos que codifican una parte inmunogénica de la proteína de fusión.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden generar utilizando la información de secuencias dada a conocer en la presente invención. El ácido nucleico que codifica cada uno de los grupos X e Y se puede clonar o amplificar utilizando ADNc o, de forma alternativa, ADN genómico, como un molde y sondas o cebadores de oligonucleótidos apropiados según técnicas de biología molecular estándar (por, ejemplo, tal como se describe en Sambrook y otros, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001) o técnicas de amplificación por PCR estándar basadas en los datos de secuencias accesibles en la técnica (tales como los que se dan a conocer anteriormente en relación con las proteínas de fusión o los que se dan a conocer en la parte de ejemplos). La fusión de la secuencia X a la secuencia Y se puede realizar tal como se describe en los ejemplos siguientes o mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, las secuencias que codifican X e Y se pueden ligar en el marco de lectura de forma directa o a través de una secuencia que codifica un péptido enlazador. La secuencia que codifica X también se puede insertar directamente en un vector que contiene la secuencia que codifica Y, o viceversa. De forma alternativa, la amplificación por PCR de las secuencias que codifican X e Y se puede llevar a cabo utilizando cebadores que ocasionan salientes complementarios que se pueden hibridar posteriormente y amplificar de nuevo para generar una secuencia de gen de fusión.

También se da a conocer en la presente invención un vector que contiene la molécula de ácido nucleico de la presente invención.

El término "vector", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a vectores tanto de expresión como no expresión e incluye vectores virales, así como no virales, incluyendo plásmidos circulares autorreplicantes autónomos. Cuando se describe que un microorganismo o cultivo celular recombinantes hospedan un "vector de expresión", éste incluye tanto ADN circular extracromosómico como ADN que se ha incorporado en el cromosoma o cromosomas del huésped. Los vectores preferentes de la presente invención son vectores de expresión. Un vector de expresión contiene múltiples elementos genéticos orientados de manera posicional y secuencial, es decir, unidos de forma operativa con otros elementos necesarios, de manera que la molécula de ácido nucleico en el vector que codifica las proteínas de fusión de la presente invención se puede transcribir y, cuando es necesario, traducir en las células huésped.

Se puede utilizar cualquier tipo de vector en el contexto de la presente invención, ya sea de origen plasmídico o viral, ya sea un vector integrador o no integrador. Dichos vectores están disponibles comercialmente o se describen en la literatura. Particularmente importantes en el contexto de la presente invención son los vectores para la utilización en terapia génica (es decir, que son capaces de liberar la molécula de ácido nucleico a una célula diana), así como vectores de expresión para la utilización en técnicas recombinantes (es decir, que son capaces, por ejemplo, de expresar la molécula de ácido nucleico en células huésped cultivadas).

Los vectores de la presente invención pueden actuar en células procariotas o eucariotas o en ambas (vectores lanzadera). Entre los vectores adecuados se incluyen, sin limitación, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, cromosomas artificiales, tales como BAC, PAC, YAC o MAC y vectores derivados de virus, tales como baculovirus, papovavirus (por ejemplo, SV40), virus del herpes, adenovirus, virus asociados a adenovirus (AAV), poxvirus, virus espumosos, y retrovirus. Los vectores también pueden derivar de combinaciones de estas fuentes, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmido y bacteriófago, por ejemplo, cósmidos y fagémidos. Los vectores virales pueden ser competentes con la replicación, replicativos de forma condicional o defectuosos en la replicación. En el caso en el que la replicación viral sea defectuosa, la replicación tendrá lugar en células huésped que proporcionan funciones que complementan los defectos.

Entre los ejemplos de plásmidos adecuados se incluyen, pero sin limitación a éstos, los derivados de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), p Poly (Lathe y otros, 1987, Gene 57, 193-201), pTrc (Amann y otros, 1988, Gene 69, 301-315) y pET 11d (Studier y otros, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, 60-89). Se sabe que la forma del plásmido puede afectar en la eficacia de la expresión, y es preferente que una fracción grande del vector esté en forma superenrollada. Entre los ejemplos de vectores para la expresión en levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*) se incluyen pYepSec1 (Baldari y otros, 1987, EMBO J. 6, 229-234), pMFa (Kujan y otros, 1982, Cell 30, 933-943), pJRY88 (Schultz y otros, 1987, Gene 54, 113-123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, California). Los vectores de la presente invención también pueden derivar de baculovirus a expresar en células cultivadas de insectos (por ejemplo, células Sf9).

Según una realización preferente de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente invención se expresan mediante la utilización de vectores de expresión de mamífero. Entre los ejemplos de vectores de expresión de mamífero se incluyen pREP4, pCEP4 (Invitrogene), pCI (Promega), pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840) y pMT2PC (Kaufman y otros, 1987, EMBO J. 6, 187-195). Los vectores de expresión indicados en la presente invención se proporcionan sólo a modo de ejemplo de algunos vectores conocidos disponibles para los expertos en la materia. La persona experta en la materia es conocedora de otros vectores adecuados para el mantenimiento, propagación o expresión de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente invención.

Además, el vector de la presente invención también puede comprender un gen marcador a efectos de seleccionar o identificar las células transfectadas (por ejemplo, mediante complementación de la auxotrofia de una célula o mediante resistencia a antibiótico), elementos de estabilización (por ejemplo, la secuencia *cer*, Summers y Sherrat, 1984, Cell 36, 1097-1103), elementos integradores (por ejemplo, secuencias virales LTR y transposones), así como elementos que proporcionan una función autorreplicante y que permiten que el vector se mantenga de forma estable en las células, independientemente del número de copias del vector en la célula. Los marcadores incluyen genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para células huésped procariotas y resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para células huésped eucariotas. Sin embargo, cualquier marcador que proporcione una selección por una característica fenotípica será eficaz. La función de autorreplicación se puede proporcionar mediante la utilización de un origen de replicación viral y la disposición de uno o más factores de replicación virales que son necesarios para la replicación mediada por ese origen viral particular (WO 95/32299). Los orígenes de replicación y cualquier factor de replicación se pueden obtener de un conjunto de virus, incluyendo el virus de Epstein-Barr (EBV), virus de papiloma humano y bovino y papovavirus BK.

Los vectores particularmente preferentes de la presente invención son vectores virales y, de manera especial, vectores adenovirales, que presentan un conjunto de ventajas bien documentadas como vectores para terapia génica. El genoma adenoviral consiste en una molécula de ADN de doble cadena lineal de aproximadamente 36 kb que tiene más de aproximadamente treinta genes necesarios para completar el ciclo viral. Los genes tempranos se dividen en 4 regiones (E1 a E4) que son esenciales para la replicación viral (Pettersson y Roberts, 1986 en Cancer Cells (Vol 4): DNA Tumor Viruses), Botchan y Glodzicker Sharp Eds págs. 37-47, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Halbert y otros, 1985, J. Virol. 56, 250-257) con la excepción de la región E3, la cual se cree que es prescindible para la replicación viral en base a la observación de que virus mutantes naturales o virus híbridos eliminados de la

región E3 aún se replican como virus de tipo salvaje en células cultivadas (Kelly y Lewis, 1973, *J. Virol.* 12, 643-652). Los productos génicos de E1 codifican proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma viral. Los productos génicos de E2 son necesarios para el inicio y elongación de la cadena en la síntesis de ADN viral. Las proteínas codificadas por la región E3 evitan la citólisis mediante células T citotóxicas y el factor de necrosis tumoral (Wold y Gooding, 1991, *Virology* 184, 1-8). Las proteínas codificadas por la región E4 están implicadas en la replicación de ADN, la expresión y corte y empalme ("splicing") de genes tardíos y la inhibición de la célula huésped (Halbert y otros, 1985, *J. Virol.* 56, 250-257). Los genes tardíos (L1 a L5) codifican en su mayoría las proteínas estructurales que constituyen la cápside viral. Éstas se solapan, como mínimo en parte, con las unidades de transcripción temprana y se transcriben a partir de un único promotor (MLP por Promotor Temprano Principal). Además, el genoma adenoviral tiene ITR (Repetición Terminal Invertida) en ambos extremos 5' y 3' terminales que actúan en *cis* y la región de encapsidación, ambas esenciales para la replicación de ADN. Estas ITR albergan orígenes de replicación de ADN, mientras que la región de encapsidación es necesaria para el empaquetamiento del ADN adenoviral en partículas infecciosas.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "vector adenoviral" comprende el ADN vector, así como partículas virales generadas del mismo mediante tecnologías convencionales.

Los vectores adenovirales para la utilización según la presente invención infectan, preferentemente, células humanas. Se pueden derivar de cualquier fuente humana o animal, en particular adenovirus canino (por ejemplo, CAV-1 o CAV-2; Banco de genes referencias CAV1GENOM y CAV77082, respectivamente), aviar (Banco de Genes referencia AAVEDSDNA), bovino (tal como BAV3; Seshidhar Reddy y otros, 1998, *J. Virol.* 72, 1394-1402), murino (Banco de Genes referencia ADRMUSMAV1), ovino, felino, porcino o de simio o, de forma alternativa, de un híbrido de los mismos. Se puede utilizar cualquier serotipo de los serotipos de adenovirus 1 a 51. Por ejemplo, un adenovirus puede ser del subgrupo A (por ejemplo, los serotipos 12, 18 y 31), el subgrupo B (por ejemplo, los serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34 y 35), el subgrupo C (por ejemplo, los serotipos 1, 2, 5 y 6), el subgrupo D (por ejemplo, los serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39 y 42-47), el subgrupo E (serotipo 4), el subgrupo F (serotipos 40 y 41) o cualquier otro serotipo adenoviral. Sin embargo, son preferentes los adenovirus humanos de los subgrupos B o C y, de forma especial, los adenovirus 2 (Ad2), 5 (Ad5) y 35 (Ad35). En general, las reservas de adenovirus que se pueden utilizar como fuente de los adenovirus citados están disponibles actualmente en la American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos tipo) (ATCC, Rockville, Md.) o de cualquier otra fuente. Además, dichos adenovirus han sido objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, organización y biología, lo que permite al técnico su aplicación. Los vectores adenovirales, métodos de producción de vectores adenovirales y métodos de utilización de vectores adenovirales se dan a conocer, por ejemplo, en los documentos US 6.133.028 y US 6.040.174, US 6.110.735, US 6.399.587, WO/00/50573 y EP 1016711 para los vectores adenovirales que pertenecen al grupo C y, por ejemplo, en los documentos US 6.492.169 y WO 02/40665 para los vectores adenovirales que no pertenecen al grupo C.

En una realización, el vector adenoviral de la presente invención es competente en la replicación. El término "competente en la replicación", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un vector adenoviral capaz de replicarse en una célula huésped en ausencia de cualquier trans-complementación. En el contexto de la presente invención, este término también comprende vectores adenovirales selectivos en la replicación o replicativos de forma condicional, los cuales se diseñan para replicarse mejor o selectivamente en células huésped cancerosas o hiperproliferativas. Ejemplos de dichos vectores adenovirales competentes en la replicación son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Hernández-Alcoceba y otros, 2000, *Human Gene Ther.* 11, 2009-2024; Nemunaitis y otros, 2001, *Gene Ther.* 8, 746-759; Alemany y otros, 2000, *Nature Biotechnology* (Biotecnología de la naturaleza) 18, 723-727).

Los vectores adenovirales competentes en la replicación según la presente invención pueden ser un genoma de adenovirus de tipo salvaje o pueden derivar del mismo mediante la introducción de modificaciones en el genoma viral, por ejemplo, para el objetivo de generar un vector adenoviral replicativo de forma condicional. Dicha modificación o modificaciones incluyen la delección, inserción y/o mutación de uno o más nucleótidos en las secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras. Las modificaciones preferentes son aquellas que hacen que dicho vector adenoviral competente en la replicación sea dependiente de las actividades celulares presentes de manera específica en un tumor o célula cancerosa. En este aspecto, el gen o genes virales que se convierten en prescindibles en células tumorales, tales como los genes responsables de la activación del ciclo celular a través de la unión a p53 o Rb, se pueden eliminar completa o parcialmente o mutar. A modo de ilustración, dichos vectores adenovirales replicativos de forma condicional se pueden diseñar mediante la delección completa del gen de E1B adenoviral que codifica la proteína de 55 kDa o la delección completa de la región E1B para suprimir la unión a p53 (véase, por ejemplo, los documentos US 5.801.029 y 5.846.945). Esto evita que el virus inactivo la supresión del tumor en células normales, lo cual significa que el virus no se puede replicar. Sin embargo, el virus se replicará y lisará células que han inactivado la expresión de p53 o Rb a través de la transformación oncogénica. Como otro ejemplo, la delección completa de la región E1A hace que el vector adenoviral sea dependiente de las actividades de tipo E1A intrínsecas o inducidas por IL-6. De manera opcional, también se puede introducir una mutación inactivante en la región E1A para eliminar la unión a Rb. La mutación/delección defectuosa en Rb se introduce preferentemente en el dominio CR1 y/o CR2 de E1A (véase, por ejemplo, el documento WO 00/24408). En una segunda estrategia, de manera opcional o en combinación con la primera estrategia, los promotores virales nativos que controlan la transcripción de los genes virales se pueden sustituir con promotores específicos de tejido o de tumor. A modo de ilustración, la regulación de los genes de E1A y/o E1B se puede

colocar bajo el control de un promotor específico de tumor, tal como el PSA, la kaliceína, la probasina, la AFP, la a-fetoproteína o el promotor de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT) (véase, por ejemplo, los documentos US 5.998.205, WO 99/25860, US 5.698.443 y WO 00/46355) o un promotor específico del ciclo celular, tal como el promotor de E2F-1 (documentos WO00/15820 y WO01/36650). En este contexto, es preferente particularmente el vector de ejemplo designado como ONYX-411 que combina una delección defectuosa en Rb de 8 residuos de aminoácidos en el dominio CR2 de E1A y la utilización del promotor E2F-1 para controlar la expresión de los genes virales de E1A y E4.

Según otra realización preferente, el vector adenoviral de la presente invención es defectuoso en la replicación. Los vectores adenovirales defectuosos en la replicación son conocidos en la técnica y se pueden definir como deficientes en una o más regiones del genoma adenoviral que son esenciales para la replicación viral (por ejemplo, E1, E2 o E4 o una combinación de las mismas) y, de este modo, son incapaces de propagarse en ausencia de trans-complementación (por ejemplo, proporcionada por las células de complementación o un virus auxiliar). El fenotipo defectuoso en la replicación se obtiene mediante la introducción de modificaciones en el genoma viral para eliminar la función de uno o más genes virales esenciales para la replicación viral. Los vectores defectuosos en la replicación preferentes presentan E1 eliminada y, de este modo, son defectuosos en la función de E1. Entre dichos vectores adenovirales con E1 eliminada se incluyen los descritos en los documentos US 6.063.622; US 6.093.567; WO 94/28152; WO 98/55639 y EP 974668. Una delección de E1 preferente cubre aproximadamente los nucleótidos (nt) 459 a 3328 ó 459 a 3510, en referencia a la secuencia del adenovirus humano de tipo 5 (dado a conocer en el Banco de Genes bajo el número de acceso M73260 y en Chroboczek y otros, 1992, *Virology*, 186, 280-285).

Además, el esqueleto adenoviral del vector puede comprender modificaciones (por ejemplo, delecciones, inserciones o mutaciones) en una región o regiones virales adicionales, para acabar con la síntesis residual de los antígenos virales y/o mejorar la expresión a largo plazo de las moléculas de ácido nucleico en las células transducidas (véase, por ejemplo, el documento WO 94/28152; Lusky y otros, 1998, *J. Virology*, 72, 2022-2032; Yeh y otros, 1997, *FASEB J.* 11, 615-623). En este contexto, la presente invención contempla la utilización de vectores adenovirales que carecen de las funciones de E1, o E1 y E2, o E1 y E3, o E1 y E4, o E1 y E2 y E3, o E1 y E2 y E4, o E1 y E3 y E4, o E1 y E2 y E3 y E4. Un vector adenoviral defectuoso en la función de E2 se puede eliminar de toda o parte de la región E2 (preferentemente en la región E2A o, de forma alternativa, en la región E2B, o tanto en la región E2A como E2B) o comprende una o más mutaciones, tales como la mutación termosensible del gen que codifica la DBP (Proteína de Unión a ADN) (Ensinger y otros, *J. Virology*, 10 (1972), 328-339). El vector adenoviral también se puede eliminar de toda o parte de la región E4 (véase, por ejemplo, los documentos EP 974668 y WO 00/12741). Un ejemplo de delección de E4 cubre aproximadamente los nucleótidos desde la posición 32994 a la posición 34998 en referencia a la secuencia del adenovirus humano de tipo 5. Además, las delecciones en la región E3 no esencial (por ejemplo, desde la posición 28597 a la posición 30469 de Ad5) pueden incrementar la capacidad de clonación, pero pueden ser ventajosas para mantener las secuencias de E3 que codifican gp19k, 14.7K y/o RID permitiendo escapar del sistema inmune del huésped (Gooding y otros, 1990, *Critical Review of Immunology* 10, 53-71) y reacciones inflamatorias (documento EP 00440267.3). También es imaginable utilizar un vector adenoviral mínimo (o "gutless") que carece de todos los genes funcionales incluyendo los genes tempranos (E1, E2, E3 y E4) y tardíos (L1, L2, L3, L4 y L5) con la excepción de las secuencias que actúan en *cis* (véase, por ejemplo, Kovetski y otros, 1997, *Current Opinion in Biotechnology* (Opinión Actual de la Biotecnología) 8, 583-589; Yeh y Perricaudet, 1997 *FASEB J.* 11, 615-623; los documentos WO 94/12649 y WO94/28152). El vector adenoviral deficiente en la replicación se puede diseñar fácilmente por un experto en la materia, teniendo en cuenta las secuencias mínimas requeridas y no se limita a estas realizaciones de ejemplo.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede insertar en cualquier localización del genoma adenoviral, con la excepción de las secuencias que actúan en *cis*. Preferentemente, se inserta en sustitución de una región eliminada (E1, E3 y/o E4), con una especial preferencia por la región E1 eliminada. Además, el cassette de expresión se puede situar en orientación de sentido o antisentido en relación con la dirección transcripcional natural de la región en cuestión.

Un vector retroviral también es adecuado en el contexto de la presente invención. Los retrovirus son una clase de virus integradores que se replican utilizando una transcriptasa inversa codificada por el virus, para replicar el genoma del ARN viral en ADN de doble cadena que se integra en el ADN cromosómico de las células infectadas. Los numerosos vectores descritos en la literatura se pueden utilizar en el marco de la presente invención y especialmente los derivados de virus de leucemia murinos, especialmente la cepa Moloney (Gilboa y otros, 1988, *Adv. Exp. Med. Biol.* 241, 29) o la cepa FB29 de Friend (documento WO 95/01447). En general, un vector retroviral se elimina de todos o parte de los genes virales gag, pol y env y mantiene las LTR 5' y 3' y una secuencia de encapsidación. Estos elementos se pueden modificar para aumentar el nivel de expresión o estabilidad del vector retroviral. Dichas modificaciones incluyen la sustitución de la secuencia de encapsidación retroviral por una de un retrotransposón, tal como VL30 (documento US 5.747.323). La molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede insertar en dirección 3' de la secuencia de encapsidación, preferentemente en la dirección opuesta en relación al genoma retroviral.

Un vector poxviral también es adecuado en el contexto de la presente invención. Los poxvirus son un grupo de virus con envoltura compleja que se diferencian de los virus mencionados anteriormente por su genoma de ADN grande y su sitio de replicación citoplasmático. El genoma de varios miembros de poxviridae se ha mapeado y secuenciado. Es un ADN de doble cadena de aproximadamente 200 kb que codifica aproximadamente 200 proteínas de las cuales aproximadamente 100 están implicadas en el ensamblaje de virus. En el contexto de la presente invención, un vector poxviral se puede obtener de cualquier miembro de poxviridae, en particular viruela de canario, viruela aviar y

5 virus vaccinia, siendo éste último el preferente. Entre los virus vaccinia adecuados se incluyen, sin limitación, la cepa Copenhagen (Goebel y otros, 1990, *Virology* 179, 247-266 y 517-563; Johnson y otros, 1993, *Virology* 196, 381-401), la cepa Wyeth y la cepa Ankara modificada (MVA) (Antoine y otros, 1998, *Virology* 244, 365-396). Las condiciones generales para la construcción de poxvirus que comprenden una molécula de ácido nucleico son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos EP 83286; EP 206920 para los virus vaccinia Copenhagen y Mayr y otros, 1975, *Infection* (Infección) 3, 6-14; Sutter y Moss, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10847-10851, el documento US 6.440.422 para los virus MVA). La molécula de ácido nucleico de la presente invención se inserta preferentemente en el genoma poxviral en un locus no esencial, tal como regiones intergénicas no codificantes o cualquier gen para el que la inactivación o delección no perjudique significativamente en el crecimiento viral y la replicación. El gen de timidina quinasa es particularmente apropiado para la inserción en los virus vaccinia Copenhagen (Hruby y otros, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3411-3415; Weir y otros, 1983, *J. Virology* 46, 530-537). En cuanto a MVA se refiere, la inserción de la molécula de ácido nucleico se puede realizar en cualquiera de las escisiones I a VII y preferentemente en la escisión II o III (Meyer y otros, *J. Gen. Virology* 72, 1031-1038; Sutter y otros, 1994, *Vaccine* (Vacuna) 12, 1032-1040) o en el locus D4R. Para los virus de viruela aviar, aunque se puede considerar la inserción en el gen de timidina quinasa, la molécula de ácido nucleico se introduce preferentemente en una región intergénica no codificante (véase, por ejemplo, los documentos EP 314569 y US 5.180.675). También se puede prever la inserción en el locus viral esencial siempre y cuando la función defectuosa se disponga en *trans*, a través de un virus auxiliar o mediante la expresión en la línea de células productoras. Los vectores poxvirales adecuados se pueden generar fácilmente a partir de poxvirus de tipo salvaje disponibles en colecciones reconocidas, tales como ATCC (ATCC VR-251 para viruela aviar, ATCC VR-267 para la viruela de mono, ATCC VR-363 para viruela de cerdo, ATCC VR-111 para viruela de canario, ATCC VR-302 para viruela de vaca) o ICTV (Canberra, Australia) (virus Copenhagen código 58.1.1.0.001; número de acceso del Banco de Genes M35027).

25 Según una realización preferente, los vectores de la presente invención comprenden la molécula de ácido nucleico de la presente invención en una forma adecuada para su expresión en una célula u organismo huésped, lo cual significa que la molécula de ácido nucleico se coloca bajo el control de una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base al tipo de vector y/o la célula huésped, que están unidas operativamente a la molécula de ácido nucleico a expresar. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "secuencia reguladora" se refiere a cualquier secuencia que permita, contribuya o module la regulación funcional de la molécula de ácido nucleico, incluyendo la replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme ("splicing"), traducción, estabilidad y/o transporte del ácido nucleico o uno de sus derivados (es decir, ARNm) en la célula u organismo huésped. En el contexto de la presente invención, este término comprende promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación y elementos que afectan a la estabilidad del ARNm). "Unida operativamente" pretende dar a entender que la molécula de ácido nucleico de interés está unida a la secuencia o secuencias reguladoras de manera que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, en una célula u organismo huésped). Los expertos en la materia entenderán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores, tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc.

40 Las secuencias reguladoras incluyen promotores que dirigen la expresión constitutiva de una molécula de ácido nucleico en muchos tipos de célula huésped y aquellos que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido) o en respuesta a sucesos específicos o factores exógenos (por ejemplo, mediante la temperatura, adición de nutrientes, hormona u otro ligando).

45 Las secuencias reguladoras adecuadas útiles en el contexto de la presente invención incluyen, pero sin limitación a las mismas, el promotor izquierdo del bacteriófago lambda, los promotores lac, TRP y TAC de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor o potenciador temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) (Boshart y otros, 1985, *Cell* 41, 521-530), los promotores temprano y tardío de adenovirus, el promotor de fosfogliceroquinasa (PGK) (Hitzeman y otros, 1983, *Science* 219, 620-625; Adra y otros, 1987, *Gene* 60, 65-74), el promotor de timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV)-1 y las repeticiones terminales largas LTR retrovirales (por ejemplo, MoMuLV y el virus del sarcoma de Rous (RSV)). Los promotores adecuados útiles para impulsar la expresión de la molécula de ácido nucleico de la presente invención en un vector poxviral incluyen los promotores 7.5K, H5R, TK, p28, p11 o K1L del virus vaccinia. De forma alternativa, se puede utilizar un promotor sintético, tal como los descritos en Chakrabarti y otros (1997, *Biotechniques* 23, 1094-1097), Hammond y otros (1997, *J. Virological Methods* 66, 135-138) y Kumar y Boyle (1990, *Virology* 179, 151-158), así como promotores quiméricos entre los promotores poxvirales temprano y tardío.

55 Los promotores inducibles son regulados por compuestos suministrados de forma exógena e incluyen, sin limitación, el promotor de metalotioneína (MT) inducible por zinc (Mc Ivor y otros, 1987, *Mol. Cell Biol.* 7, 838-848), el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema de promotores de la T7 polimerasa (WO 98/10088), el promotor de ecdisona en insecto (No y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3346-3351), el promotor reprimible por tetraciclina (Gossen y otros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5547-5551), el promotor inducible por tetraciclina (Kim y otros, 1995, *J. Virology* 69, 2565-2573), el promotor inducible por RU486 (Wang y otros, 1997, *Nat. Biotech.* 15, 239-243 y Wang y otros, 1997, *Gene Ther.* 4, 432-441) y el promotor inducible por rapamicina (Magari y otros, 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 2865-2872).

60 Las secuencias reguladoras en la utilización en el contexto de la presente invención también pueden ser específicas de tejido para impulsar la expresión de la molécula de ácido nucleico en los tejidos en los que se desea

el efecto terapéutico. Entre las secuencias reguladoras de ejemplo específicas del hígado se incluyen, pero sin limitación a éstas, las de los genes de HMG-CoA reductasa (Luskey, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7, 1881-1893); elemento regulador 1 de esterol (SRE-1; Smith y otros, 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 2306-2310); albúmina (Pinkert y otros, 1987, *Genes Dev.* 1, 268-277); fosfoenol piruvato carboxi quinasa (PEPCK) (Eisenberger y otros, 1992, *Mol. Cell Biol.* 12, 1396-1403); proteína C-reactiva humana (CRP) (Li y otros, 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 4136-4142); glucoquinasa humana (Tanizawa y otros, 1992, *Mol. Endocrinology* 6, 1070-1081); colesterol 7-alfa hidroxilasa (CYP-7) (Lee y otros, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 14681-14689); alfa-1 antitripsina (Ciliberto y otros, 1985, *Cell* 41, 531-540); proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina (IGFBP-1) (Babajko y otros, 1993, *Biochem Biophys. Res. Comm.* 196, 480-486); transferrina humana (Mendelzon y otros, 1990, *Nucl. Acids. Res.* 18, 5717-5721); colágeno tipo I (Houglum y otros, 1994, *J. Clin. Invest.* 94, 808-814) y FIX (US 5.814.716). Entre las secuencias reguladoras de ejemplo específicas de la próstata se incluyen, pero sin limitación a éstas, las de los genes de la fosfatasa de ácido prostático (PAP) (Banas y otros, 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1217, 188-194); proteína 94 secretora prostática (PSP 94) (Nolet y otros, 1991, *Biochim. Biophys. Acta*, 1089, 247-249); complejo de antígenos específicos de próstata (Kasper y otros, 1993, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 47, 127-135); kaliceína glandular humana (hgt-1) (Lilja y otros, 1993, *World. J. Urology* 11, 188-191). Entre las secuencias reguladoras de ejemplo específicas del páncreas se incluyen, pero sin limitación a éstas, las del promotor de la proteína asociada a la pancreatitis (PAP) (Dusetti y otros, 1993, *J. Biol. Chem.* 268, 14470-14475); potenciador de la elastasa 1 transcripcional (Kruse y otros, 1993; *Genes and Development* 7, 774-786); promotor/potenciador de amilasa y elastasa específicas de páncreas (Wu y otros, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11, 4423-4430; Keller y otros, 1990, *Genes & Dev.* 4, 1316-1321); promotor del gen colesterol esterasa pancreática (Fontaine y otros, 1991, *Biochemistry* 30, 7008-7014) y el promotor del gen de la insulina (Edlund y otros, 1985, *Science* 230, 912-916). Entre las secuencias reguladoras de ejemplo específicas de las neuronas se incluyen, pero sin limitación a éstas, los promotores de genes de la enolasa específica de neurona (NSE) (Forss-Petter y otros, 1990, *Neuron* 5, 187-197) y del neurofilamento (Byrne y Ruddle, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5473-5477). Entre las secuencias reguladoras de ejemplo para la expresión en el cerebro se incluyen, pero sin limitación a éstas, el promotor de cadena pesada de neurofilamento (NF-H) (Schwartz y otros, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 13444-13450). Entre las secuencias reguladoras de ejemplo específicas linfoides se incluyen, pero sin limitación a éstas, el promotor de CGL1/grancima B humana (Hanson y otros, 1991, *J. Biol. Chem.* 266, 24433-24438); desoxi transferasa terminal (TdT), promotores de proteína tirosina quinasa específica de linfocito (p56lck) (Lo y otros, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11, 5229-5243); el promotor/potenciador de CD2 humano (Lake y otros, 1990, *EMBO J.* 9, 3129-3136), los promotores de la activación específica de células NK y células T humanas (NKG5) (Houchins y otros, 1993, *Immunogenetics* 37, 102-107), del receptor de células T (Winoto y Baltimore, 1989, *EMBO J.* 8, 729-733) y de la inmunoglobulina (Banerji y otros, 1983, *Cell* 33, 729-740; Queen y Baltimore, 1983, *Cell* 33, 741-748). Entre las secuencias reguladoras de ejemplo específicas del colon se incluyen, pero sin limitación a éstas, los promotores de tirosina quinasa pp60c-src (Talamonti y otros, 1993, *J. Clin. Invest.* 91, 53-60); neoantígenos específicos de órganos (OSN), (p40) de peso molecular 40 kDa (Iltantzis y otros, 1993, *Microbiol. Immunol.* 37, 119-128); y promotor del antígeno P específico de colon (Sharkey y otros, 1994, *Cancer* 73, 864-877). Entre las secuencias reguladoras de ejemplo para la expresión en células de glándula mamaria y mama se incluyen, pero sin limitación a éstas, los promotores de la alfa-lactoalbúmina humana (Thean y otros, 1990, *British J. Cancer* 61, 773-775) y el suero de la leche (documento US 4.873.316). Entre las secuencias reguladoras de ejemplo específicas de músculo se incluyen, pero sin limitación a éstas, los promotores de SM22 (documentos WO 98/15575; WO 97/35974), desmina (WO 96/26284), creatina quinasa mitocondrial (MCK), y el promotor quimérico dado a conocer en el documento EP 1310561. Entre las secuencias reguladoras de ejemplo específicas de pulmón se incluyen, pero sin limitación a éstas, los promotores de CFTR y tensoactivo.

Los promotores adicionales adecuados para la utilización en la presente invención se pueden tomar de genes que se expresan de manera preferente en células tumorales proliferativas. Dichos genes se pueden identificar, por ejemplo, mediante la expresión e hibridación genómica comparativa (véase, por ejemplo, los documentos US 5.759.776 y 5.776.683). Entre los promotores específicos de tumor se incluyen, pero sin limitación a éstos, los promotores del gen MUC-1 sobreexpresado en los cánceres de mama y próstata (Chen y otros, 1995, *J. Clin. Invest.* 96, 2775-2782), del gen que codifica el Antígeno Embrionario de Carcinoma (CEA) sobreexpresado en cánceres de colon (Schrewe y otros, 1990, *Mol. Cell. Biol.* 10, 2738-2748), del gen que codifica ERB-2 sobreexpresado en cánceres de mama y páncreas (Harris y otros, 1994, *Gene Therapy* 1, 170-175), del gen de alfa-fetoproteína sobreexpresado en cánceres de hígado (Kanai y otros, 1997, *Cancer Res.* 57, 461-465), de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT) (documentos WO 99/27113, WO 02/053760 y Horikawa y otros, 1999, *Cancer Res.* 59, 826), del elemento de respuesta a la hipoxia (HRE), del receptor del factor de motilidad autocrina, de plasmina y de hexoquinasa II.

Los expertos en la materia entenderán que los elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula de ácido nucleico de la presente invención pueden comprender además elementos adicionales para un inicio, regulación y/o terminación adecuados de la transcripción y traducción en la célula u organismo huésped. Entre dichos elementos adicionales se incluyen, pero sin limitación a éstos, secuencias de exones/intrones no codificantes, secuencias de transporte, secuencias de señales de secreción, secuencias de señales de localización nuclear, IRES, secuencias de terminación de la transcripción poliA, secuencias líderes tripartito, secuencias implicadas en la replicación o integración. Entre los ejemplos ilustrativos de intrones adecuados en el contexto de la presente invención se incluyen los aislados de los genes que codifican la alfa o beta globina (es decir, el segundo intrón del gen de beta globina de conejo; Green y otros, 1988, *Nucleic Acid Res.* 16, 369; Karasuyama y otros, 1988, *Eur. J. Immunol.* 18, 97-104), ovoalbúmina, apolipoproteína, inmunoglobulina, factor IX y factor VIII, el intrón 16S/19S de SV40 (Okayma y Berg, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3, 280-289), así como intrones sintéticos, tales como el intrón presente en el vector pCI (Promega Corp,

vector de expresión de pCI de mamífero E1731) fabricado a partir de la globina beta humana dadora fusionada con la inmunoglobulina de ratón aceptora. Cuando se desea la secreción de la proteína de fusión, se incorporan en el vector señales de secreción adecuadas. La secuencia señal puede ser endógena a la proteína de fusión (por ejemplo, endógena al grupo X o Y) o heteróloga tanto al grupo X como el grupo Y implicados en la proteína de fusión. El experto en la materia es conocedor de la cantidad de secuencias reguladoras que son útiles en los vectores de expresión.

Una realización preferente de la presente invención se refiere a un vector adenoviral defectuoso en la replicación con E1 y E3 eliminadas que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención insertada en lugar de la región E1 y situada bajo el control del promotor CMV.

Además, el vector de la presente invención también puede comprender uno o más transgenes (es decir, un gen de interés a expresar junto con la molécula de ácido nucleico de la presente invención en una célula u organismo huésped). De manera deseable, la expresión del transgén presenta una actividad terapéutica o protectora contra la enfermedad o condición patológica por la que se administra el vector de la presente invención. Entre los transgenes adecuados se incluyen, sin limitación, genes que codifican (i) inhibidores de la proliferación tumoral y/o (ii) como mínimo, un antígeno específico contra el que se desea una respuesta inmune. En una forma preferente de la presente invención, el producto transgénico y la proteína de fusión actúan de manera sinérgica en la inducción de respuestas inmunes o en la producción de un efecto terapéutico (por ejemplo, antitumoral). Por consiguiente, dichas combinaciones no son sólo adecuadas para la inmunopreprofilaxis de enfermedades, sino de manera sorprendente también para la inmunoterapia de enfermedades, tales como infecciones virales, bacterianas o parasitarias, y también trastornos crónicos, tales como el cáncer.

Los inhibidores de la proliferación tumoral actúan mediante la inhibición directa del crecimiento celular, o la eliminación de células tumorales. Entre los ejemplos representativos de inhibidores de la proliferación tumoral se incluyen toxinas y genes suicidas. Entre los ejemplos representativos de toxinas se incluyen, sin limitación, ricina (Lamb y otros, 1985, Eur. J. Biochem. 148, 165-270), toxina de la difteria (Tveten y otros, 1985, J. Biol. Chem. 260, 10392-10394), toxina del cólera (Mekalanos y otros, 1983, Nature 306, 551-557; Sanchez y Holmgren, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 481-485); gelonina (Stirpe y otros, 1980, J. Biol. Chem. 255, 6947-6953), proteína antiviral (Barbieri y otros, 1982, Biochem. J. 203, 55-59; Irvin y otros, 1980, Arch. Biochem. Biophys. 200, 418-425), tritina, toxina de *Shigella* (Calderwood y otros, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4364-4368; Jackson y otros, 1987, Microb. Path. 2, 147-153) y exotoxina A de *Pseudomonas* (Carroll y Collier, 1987, J. Biol. Chem. 262, 8707-8711).

Los "genes suicidas" se pueden definir en el contexto de la presente invención como cualquier gen que codifica un producto de expresión que es capaz de transformar una sustancia inactiva (profármaco) en una sustancia citotóxica, ocasionando de este modo la muerte celular. El gen que codifica el TK HSV-1 constituye el miembro prototipo de la familia de genes suicidas (Caruso y otros, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7024-7028; Culver y otros, 1992, Science 256, 1550-1552). Aunque el polipéptido TK es no tóxico por sí mismo, cataliza la transformación de análogos de nucleósidos (profármaco), tales como aciclovir o ganciclovir. Los nucleósidos transformados se incorporan en las cadenas de ADN que se encuentran en el proceso de elongación, provocan la interrupción de dicha elongación y, por tanto, la inhibición de la división celular. Actualmente existen un gran número de combinaciones de genes suicidas/profármacos. Aquellas que se pueden mencionar de manera más específica son el citocromo p450 de rata y la ciclofosfamida (Wei y otros, 1994, Human Gene Ther. 5, 969-978), purín nucleósido fosforilasa de *Escherichia coli* (*E. coli*) y 6-metilpurin desoxirribonucleósido (Sorscher y otros, 1994, Gene Therapy 1, 223-238), guanin fosforibosil transferasa y 6-tioxantina de *E. coli* (Mzoz y otros, 1993, Human Gene Ther. 4, 589-595). Sin embargo, en una realización preferente, el vector de la presente invención comprende un gen suicida que codifica un polipéptido que presenta una actividad citosín desaminasa (CDasa) o uracil fosforibosil transferasa (UPRTasa) o ambas actividades CDasa y UPRTasa, que se puede utilizar con el profármaco 5-fluorocitosina (5-FC). Entre los genes adecuados que codifican CDasas se incluyen, pero sin limitación a éstos, el gen *FCY1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Erbs y otros, 1997, Curr. Genet. 31, 1-6; documento WO 93/01281) y el gen *codA* de *E. coli* (documento EP 402108). Entre los genes adecuados que codifican UPRTasas se incluyen, pero sin limitación a éstos, los de *E. coli* (gen *upp*; Anderson y otros, 1992, Eur. J. Biochem. 204, 51-56) y *Saccharomyces cerevisiae* (gen *FUR-1*; Kern y otros, 1990, Gene 88, 149-157). Preferentemente, el gen que codifica CDasa deriva del gen *FCY1* y el gen que codifica UPRTasa deriva del gen *FUR-1*. Es particularmente importante la utilización de una proteína de fusión que codifica dos enzimas de dominio que poseen ambas actividades CDasa y UPRTasa (*FCU-1*) tal como se describe en el documento WO 99/54481.

Los antígenos específicos son preferentemente aquellos susceptibles de conferir una respuesta inmune, específica y/o no específica, mediada por anticuerpo y/o célula, contra un patógeno determinado (virus, bacteria, hongo o parásito) o contra un elemento no autoantígenos (por ejemplo, un antígeno asociado a tumor). Preferentemente, el antígeno seleccionado comprende un epítipo que se une a la superficie celular y se presenta sobre la misma mediante proteínas MHC de clase I. Entre los ejemplos representativos de antígenos específicos se incluyen, sin limitación:

- El antígeno o antígenos del antígeno de la superficie de la Hepatitis B son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, los antígenos PreS1, PreS2 descritos en las solicitudes de patente europea EP 414374; EP 304578 y EP 198474.

- Los antígenos del virus de la Hepatitis C que incluyen cualquier antígeno inmunogénico o fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en el Núcleo (C), la glicoproteína de envoltura E1, E2, el polipéptido no estructural NS2, NS3, NS4 (NS4a y/o NS4b), NS5 (NS5a y/o NS5b) o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, NS3 y NS4, NS3 y NS4 y NS5b)
- El antígeno o antígenos del virus VIH-1, especialmente gp120 y gp160 (tal como se describen en el documento WO 87/06260).
- El antígeno o antígenos derivados del Virus del Papiloma Humano (HPV) que se considera asociado a verrugas genitales (HPV6 o HPV11 y otros) y cáncer cervical (HPV16, HPV18, HPV31, HPV-33 y otros). Los antígenos de HPV particularmente importantes se seleccionan del grupo que consiste en E5, E6, E7, L1 y L2, ya sea de forma individual o en combinación (véase, por ejemplo, los documentos WO 94/00152, WO 94/20137, WO 93/02184, WO 90/10459 y WO 92/16636). Particularmente importantes en el contexto de la presente invención son las formas ancladas a membrana de las variantes no oncogénicas de los antígenos E6 y/o E7 tempranos de HPV-16 (tal como se describe en el documento WO 99/03885) que son particularmente adecuadas para conseguir un efecto antitumoral contra un cáncer asociado a HPV.
- Los antígenos de parásitos que provocan la malaria. Por ejemplo, antígenos preferentes de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS (documento WO 93/10152) y TRAP (documento WO 90/01496). Otros antígenos de plasmodia que son probables candidatos son MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 de *P. falciparum* y sus análogos en otras especies de *Plasmodium*.
- Otros antígenos adecuados incluyen antígenos asociados a tumor, tales como los asociados a cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal, hígado, vejiga, sarcoma o melanoma. Entre los ejemplos de antígenos se incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 u otros antígenos MAGE (documento WO 99/40188) PRAME, BAGE, Lage (también conocido como NY Eos 1), SAGE y HAGE (documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, *Current Opinions in Immunol.* 8, págs. 628-636). Otros antígenos asociados a tumor adecuados incluyen los conocidos como prostasas, que incluyen antígeno específico de Próstata (PSA), PAP, PSCA, PSMA. La secuencia de nucleótidos de prostasa y la secuencia de polipéptidos deducida y homólogos se dan a conocer en Ferguson y otros (1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3114-3119) y los documentos WO 98/12302, WO 98/20117 y WO 00/04149. Otros antígenos asociados a tumor adecuados incluyen los asociados con el cáncer de mama, tales como BRCA-1, BRCA-2 y MUC-1 (véase, por ejemplo, WO 92/07000).

El transgén que se utiliza en la presente invención se sitúa bajo el control de elementos reguladores adecuados para permitir su expresión en la célula u organismo huésped seleccionados, ya sea de forma constitutiva o inducible. La elección de dichos elementos reguladores se encuentra al alcance del experto en la materia. Se selecciona preferentemente del grupo que consiste en promotores constitutivos, inducibles, específicos de tumor y específicos de tejido, tal como se ha descrito anteriormente en relación con la expresión de la proteína de fusión de la presente invención. En un ejemplo, el transgén se sitúa bajo el control del promotor de CMV para asegurar un nivel de expresión elevado.

El transgén que se utiliza en la presente invención se puede insertar en cualquier punto del vector. Según una alternativa, se sitúa preferentemente no cerca de la molécula de ácido nucleico de la presente invención. Según otra alternativa, se puede situar en orientación antisentido con respecto a la molécula de ácido nucleico a efectos de evitar la interferencia transcripcional entre los dos cassettes de expresión. Por ejemplo, en un genoma adenoviral, el transgén se puede insertar en una región eliminada diferente con respecto a la molécula de ácido nucleico de la presente invención (E1, E3 y/o E4) o en la misma región eliminada que dicha molécula de ácido nucleico, pero en orientación antisentido entre sí.

La introducción de la molécula de ácido nucleico de la presente invención en un esqueleto de vector se puede realizar mediante cualquier estrategia de ingeniería genética apropiada en la técnica para cualquier tipo de vector, tal como mediante métodos descritos en Sambrook y otros (2001, *Molecular Cloning – A Laboratory Manual* (Clonación Molecular – Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory). Habitualmente, para la introducción de la molécula de ácido nucleico en un vector adenoviral, se diseña un plásmido bacteriano que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión para sustituir un gen adenoviral necesario para la replicación o ensamblaje (por ejemplo, E1) por la molécula de ácido nucleico sustituta. A continuación, se utiliza el plásmido como un vector lanzadera y se combina con un segundo plásmido que contiene la parte complementaria del genoma de adenovirus, permitiendo que tenga lugar la recombinación homóloga mediante el solapamiento de las secuencias de adenovirus en los dos plásmidos. La recombinación también se puede realizar directamente en un huésped mamífero adecuado (tal como 293, tal como se describe en Graham y Preveet, 1991, *Methods in Molecular Biology* (Métodos en Biología Molecular), Vol 7 "Gene Transfer and Expression Protocols" ("Transferencia de Genes y Protocolos de Expresión"); Ed E. J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ) o si no, en clones YAC de levadura o *E. coli* (tal como

se describe en el documento WO 96/17070). El genoma de adenovirus completado se transfecta posteriormente en las células del huésped mamífero para la replicación y la encapsidación viral.

La presente invención también comprende vectores de la presente invención o partículas de los mismos que han sido modificados para permitir el reconocimiento preferencial de una célula diana particular. Un rasgo característico de los vectores/partículas dirigidos de la presente invención (tanto de origen viral como no viral, tales como vectores complejados con polímeros y lípidos) es la presencia en su superficie de un grupo de reconocimiento capaz de reconocer y unirse a un componente celular y expuesto a la superficie. Entre dichos grupos de reconocimiento se incluyen, sin limitación, conjugados químicos, lípidos, glicolípidos, hormonas, azúcares, polímeros (por ejemplo, PEG, polilisina, PEI y similares), péptidos, polipéptidos (por ejemplo, JTS1 tal como se describe en el documento WO 94/40958), oligonucleótidos, vitaminas, antígenos, lectinas, anticuerpos y fragmentos de los mismos. Preferentemente, son capaces de reconocer y unirse a marcadores específicos de células, marcadores específicos de tejido, receptores celulares, antígenos virales, epítopos antigénicos o marcadores asociados a tumor. En este aspecto, el reconocimiento celular de adenovirus se puede llevar a cabo mediante la modificación genética del gen viral que codifica el polipéptido de la cápside presente en la superficie del virus (por ejemplo, fibra, pentona y/o pIX). Ejemplos de dichas modificaciones se describen en la literatura (por ejemplo, en Wickam y otros, 1997, J. Virol. 71, 8221-8229; Arnberg y otros, 1997, Virol. 227, 239-244; Michael y otros, 1995, Gene Therapy 2, 660-668; los documentos WO 94/10323; EP 02360204 y WO 02/96939). Como ilustración, la inserción de una secuencia que codifica EGF en la secuencia que codifica la fibra del adenovirus permitirá reconocer las células que expresan el receptor de EGF. La modificación del tropismo poxviral también se puede conseguir tal como se describe en el documento EP 1146125. Otros métodos para el reconocimiento específico celular se pueden conseguir mediante la conjugación química de grupos de reconocimiento en la superficie de una partícula viral.

En otra realización, la presente invención se refiere a partículas virales infecciosas que comprenden las moléculas de ácido nucleico o vectores de la presente invención descritos anteriormente.

La presente invención también se refiere a un proceso para la producción de una partícula viral infecciosa, que comprende las etapas de:

- (a) introducir el vector viral de la presente invención en una línea celular adecuada,
- (b) cultivar dicha línea celular bajo condiciones adecuadas para permitir la producción de dicha partícula viral infecciosa, y
- (c) recuperar la partícula viral infecciosa producida del cultivo de dicha línea celular, y
- (d) de manera opcional, purificar dicha partícula viral infecciosa recuperada.

El vector que contiene la molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede introducir en una línea celular apropiada para la propagación o expresión utilizando técnicas conocidas fácilmente disponibles para el experto en la materia. Éstas incluyen, pero sin limitarse a las mismas, la microinyección de cantidades mínimas de ADN en el núcleo de una célula (Capechi y otros, 1980, Cell 22, 479-488), transfección mediada por CaPO_4^- (Chen y Okayama, 1987, Mol. Cell Biol. 7, 2745-2752), transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación (Chu y otros, 1987, Nucleic Acid Res. 15, 1311-1326), fusión de lipofección/liposoma (Felgner y otros, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417), bombardeo de partículas (Yang y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9568-9572), pistolas de genes, transducción, infección (por ejemplo, con una partícula viral infecciosa) y otras técnicas, tales como las halladas en Sambrook y otros (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001).

Cuando el vector de la presente invención es defectuoso, las partículas infecciosas se producen normalmente en una línea celular de complementación o a través de la utilización de un virus auxiliar, que proporciona en *trans* los genes virales no funcionales. Por ejemplo, entre las líneas celulares adecuadas para complementar los vectores adenovirales se incluyen las células 293 (Graham y otros, 1997, J. Gen Virol. 36, 59-72), así como las células PER-C6 (Fallaux y otros, 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917) utilizadas habitualmente para complementar la función de E1. Se han diseñado otras líneas celulares para complementar los vectores adenovirales doblemente defectuosos (Yeh y otros, 1996, J. Virol. 70, 559-565; Krougliak y Graham 1995, Human Gene Ther. 6, 1575-1586; Wang y otros, 1995, Gene Ther. 2, 775-783; Lusky y otros, 1998, J. Virol. 72, 2022-2033; los documentos WO 94/28152 y WO 97/04119). Las partículas virales infecciosas se pueden recuperar del sobrenadante de cultivo, pero también de las células después de la lisis y, de manera opcional, se purifican adicionalmente según técnicas estándar (cromatografía, ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio, tal como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 96/27677, WO 98/00524, WO 98/22588, WO 98/26048, WO 00/40702, EP 1016700 y WO 00/50573).

La presente invención también se refiere a células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico, vectores o partículas virales infecciosas de la presente invención descritas aquí. Para los objetivos de la presente invención, el término "célula huésped" debe entenderse de manera amplia sin ninguna limitación en cuanto a la organización particular en células de tejido, órgano o aisladas. Dichas células pueden ser de un único tipo de células o de un grupo de diferentes tipos de células y pueden comprender líneas de células cultivadas, células primarias y células proliferativas.

Por lo tanto, las células huésped incluyen células procariotas, células eucariotas inferiores, tales como levadura y otras células eucariotas, tales como células de insecto, células eucariotas de plantas y superiores, tales como células de vertebrados y, con una preferencia especial, células de mamífero (por ejemplo, humanas o no humanas). Entre las células de mamífero adecuadas se incluyen, pero sin limitación a éstas, células hematopoyéticas (totipotentes, células madre, leucocitos, linfocitos, monocitos, macrófagos, APC, células dendríticas, células no humanas, y similares), células pulmonares, células de la traquea, células hepáticas, células epiteliales, células endoteliales, células musculares (por ejemplo, músculo esquelético, músculo cardíaco o músculo liso) o fibroblastos. Entre las células huésped preferentes se incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Listeria*, *Saccharomyces*, células BHK (riñón de hámster cría), células MDCK (línea celular de riñón canino Madin-Darby), células CRFK (línea celular de riñón felino Crandell), células CV-1 (línea celular de riñón de mono africano), células COS (por ejemplo, COS-7), células de ovario de hámster chino (CHO), células NIH/3T3 de ratón, células HeLa y células Vero. Las células huésped también comprenden células de complementación capaces de complementar, como mínimo, una función defectuosa de un vector defectuoso en la replicación de la presente invención (por ejemplo, vector adenoviral), tal como la citada anteriormente.

La célula huésped de la presente invención puede contener más de una molécula de ácido nucleico, vector o partícula viral infecciosa de la presente invención. Además, puede comprender adicionalmente un vector que codifica un transgén, por ejemplo, un transgén tal como se ha descrito anteriormente. Cuando se introduce en una célula más de una molécula de ácido nucleico, vector o partícula viral infecciosa, las moléculas de ácido nucleico, vectores o partículas virales infecciosas se pueden introducir de manera independiente o simultánea.

Además, según una realización específica, la célula huésped de la presente invención se puede adicionalmente encapsular. La tecnología de encapsulación celular se ha descrito anteriormente (Tresco y otros, 1992, *ASAIO J.* 38, 17-23; Aebischer y otros, 1996, *Human Gene Ther.* 7, 851-860). Según dicha realización específica, las células huésped eucariotas transfectadas o infectadas se encapsulan con compuestos que forman una membrana microporosa y dichas células encapsuladas se pueden implantar posteriormente *in vivo*. Las cápsulas que contienen las células de interés se pueden preparar utilizando membranas microporosas huecas (por ejemplo, Akzo Nobel Faser AG, Wuppertal, Alemania; Deglon y otros 1996, *Human Gene Ther.* 7, 2135-2146) que tienen un corte de peso molecular apropiado para permitir el paso libre de proteínas y nutrientes entre la cápsula interior y exterior, evitando a la vez el contacto de las células transplantadas con las células huésped.

Un aspecto adicional de la presente descripción es un método para producir de manera recombinante la proteína de fusión, utilizando los vectores, partículas virales infecciosas y/o células huésped de la presente invención. El método para producir la proteína de fusión comprende introducir un vector o una partícula viral infecciosa de la presente invención en una célula huésped adecuada para producir una célula huésped transfectada o infectada, cultivar *in vitro* dicha célula huésped transfectada o infectada bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de la célula huésped y, a continuación, recuperar dicha proteína de fusión de dicho cultivo y, de manera opcional, purificar dicha proteína de fusión recuperada. Se espera que los expertos en la materia sean conocedores de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de las proteínas de fusión de la presente invención en células huésped apropiadas.

La célula huésped de la presente invención se produce preferentemente mediante la transfección/infección de una célula huésped con una o más moléculas recombinantes (por ejemplo, un vector de la presente invención) que comprende una o más moléculas de ácido nucleico de la presente invención. Las tecnologías de ADN recombinante se pueden utilizar para mejorar la expresión de la molécula de ácido nucleico en la célula huésped mediante la manipulación, por ejemplo, del número de copias de la molécula de ácido nucleico en una célula huésped, la eficacia con la que se transcribe la molécula de ácido nucleico, la eficacia con la que se traducen los transcritos resultantes, la eficacia de las modificaciones post-traduccionales y la utilización de la selección apropiada. Las técnicas recombinantes útiles para incrementar la expresión de moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen, pero sin estar limitadas a éstas, la utilización de vectores con un número de copias elevado, la adición de secuencias de estabilidad en el vector, la sustitución o modificación de una o más secuencias reguladoras transcripcionales (por ejemplo, promotores, operadores, potenciadores), sustitución o modificación de secuencias reguladoras traduccionales (por ejemplo, sitios de unión a ribosoma, secuencias Shine-Dalgamo), la modificación de la molécula de ácido nucleico de la presente invención para corresponderse con la utilización del codón de la célula huésped y la delección de las secuencias que desestabilizan los transcritos.

Las células huésped de la presente invención se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces y placas de petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiado para una célula huésped determinada. No se hará ningún intento por describir en detalle los diversos métodos conocidos para la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas. En una realización, el vector es un plásmido que tiene la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión en asociación operativa con elementos reguladores apropiados. Las células huésped preferentes en la utilización en el método de la presente invención son líneas celulares de mamífero, células de levadura y células bacterianas.

Cuando la proteína de fusión no se secreta fuera de la célula productora o cuando no se secreta completamente, se puede recuperar de la célula mediante procedimientos de alteración estándar, incluyendo congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica, utilización de agentes lisantes y similares. Si se secreta,

se puede recuperar directamente del medio de cultivo. A continuación, se puede recuperar la proteína de fusión y se puede purificar mediante métodos de purificación conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio, extracción con ácido, electroforesis en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectinas, o cromatografía líquida de alto rendimiento. Las condiciones y tecnología utilizadas para purificar una proteína de fusión particular de la presente invención dependerán del método de síntesis y de factores, tales como la carga neta, el peso molecular, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, y será evidente para los expertos en la materia. También se entiende que dependiendo de la célula huésped utilizada para la producción recombinante de las proteínas de fusión descritas en la presente invención, las proteínas de fusión pueden tener varios patrones de glicosilación o pueden estar no glicosiladas (por ejemplo, cuando se producen en bacterias). Además, la proteína de fusión puede incluir una metionina inicial en algunos casos como resultado de un proceso mediado por huésped.

La proteína de fusión de la presente invención se puede "purificar" en el grado de que esté sustancialmente libre de material celular. El nivel de purificación se basará en la utilización pretendida. La característica crítica es que la preparación permita la función deseada de la proteína de fusión, incluso en presencia de cantidades considerables de otros componentes. En algunas utilizaciones, "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de la proteína de fusión que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de otras proteínas (es decir, proteínas contaminantes), preferentemente menos de aproximadamente el 20% de otras proteínas, más preferentemente menos de aproximadamente el 10% de otras proteínas, o incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 5% de otras proteínas. Cuando se produce la proteína de fusión de manera recombinante, también puede estar sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20% del volumen de la preparación de proteína.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la proteína de fusión, el vector de expresión, la partícula viral infecciosa, la célula huésped de la presente invención, o cualquier combinación de los mismos (también referidos en la presente invención como "agentes activos") y, de manera opcional, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un caso especial, la composición puede comprender dos o más agentes activos, que pueden diferir en (i) la naturaleza de la proteína de fusión codificada y/o (ii) la naturaleza de la secuencia reguladora utilizada para expresar la proteína de fusión y/o (iii) la presencia adicional de un transgén y/o (iv) el esqueleto del vector.

Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar un mamífero susceptible de una enfermedad, o que padece la misma, mediante la administración de dicha composición mediante un conjunto de modos de administración, que incluyen la administración sistémica, tópica y localizada. Para la administración sistémica, es preferente la inyección, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intracardiaca, (tal como transendocardial y pericardial), intratumoral, intravaginal, intrapulmonar, intranasal, intratraqueal, intravascular, intraarterial, intracoronaria, intracerebrovascular, transdérmica (tópica) o directamente en un nódulo linfático. Las administraciones intramuscular, intradérmica, intravenosa o intratumoral constituyen las rutas preferentes para la administración sistémica. De manera alternativa, la composición de la presente invención se puede administrar a través de la ruta mucosal, tal como la ruta oral/alimentaria, nasal, intratraqueal, intravaginal o intrarectal. La ruta de administración mucosal preferente es la ruta nasal o intratraqueal.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica.

De manera adecuada, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un portador y/o diluyente apropiado para su liberación mediante inyección en un organismo humano o animal. Dicho portador y/o diluyente es no tóxico en la dosis y concentración utilizada. Se selecciona entre los utilizados habitualmente para formular composiciones para la administración parental en forma de dosis unitarias o múltiples dosis o para la infusión directa mediante infusión continua o periódica. Preferentemente, es isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica y tiene una fuerza iónica relativamente baja, tal como se dispone mediante azúcares, polialcoholes y soluciones salinas isotónicas. Entre los ejemplos representativos se incluyen agua estéril, solución salina fisiológica (por ejemplo, cloruro sódico), agua bacteriostática, solución de Ringer, soluciones de glucosa o sacarosa, solución de Hank y otras soluciones acuosas de sales fisiológicamente equilibradas (véase, por ejemplo, la edición más actual de Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Remington: La Ciencia y Práctica de la Farmacia), A. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins). El pH de la composición de la presente invención se ajusta de forma adecuada y se tampona a efectos de que sea apropiado para la utilización en humanos o animales, preferentemente a un pH fisiológico o ligeramente básico (entre aproximadamente pH 8 y aproximadamente pH 9, con una especial preferencia por pH 8,5). Entre los tampones adecuados se incluyen tampón fosfato (por ejemplo, PBS), tampón bicarbonato y/o tampón Tris. Una composición particularmente preferente se formula en sacarosa 1 M, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, Tween 80 54 mg/l, Tris 10 mM, pH 8,5. Otra composición preferente se formula en manitol 10 mg/ml, HSA 1 mg/ml, Tris 20 mM, pH 7,2 y NaCl 150 mM. Estas composiciones son estables a -70°C durante, como mínimo, seis meses.

La composición de la presente invención puede estar en varias formas, por ejemplo, en sólido (por

ejemplo, polvo, forma liofilizada), o líquida (por ejemplo, acuosa). En el caso de composiciones sólidas, los métodos de preparación preferentes son secado al vacío y liofilización que producen un polvo del agente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada de forma estéril del mismo. Si se desea, dichas soluciones se pueden almacenar en una ampolla estéril lista para la reconstitución mediante la adición de agua estéril para la inyección preparada.

Las formulaciones nebulizadas o aerolizadas también forman parte de la presente invención. Los métodos de administración intranasal son conocidos en la técnica, incluyendo la administración en forma de gotas, pulverizador o polvos en seco de la composición en la nasofaringe del individuo a tratar a partir de un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador (véase, por ejemplo, WO 95/11664). Las formulaciones entéricas, tales como cápsulas gastroresistentes, y gránulos para la administración oral, supositorios para la administración rectal o vaginal también forman parte de la presente invención. Para una administración no parental, las composiciones también pueden incluir potenciadores de absorción que incrementan el tamaño de poro de la membrana de la mucosa. Dichos potenciadores de la absorción incluyen desoxicolato sódico, glicocolato sódico, dimetil-beta-ciclodextrina, lauroil-1-lisofosfatidilcolina y otras sustancias que tienen similitudes estructurales con los dominios fosfolípidos de la membrana de la mucosa.

Las composiciones también pueden contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables para proporcionar las propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables, incluyendo, por ejemplo, la modificación o mantenimiento del pH, la osmolaridad, viscosidad, claridad, color, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución de la formulación, modificación o mantenimiento de la liberación o absorción en un organismo humano animal. Por ejemplo, se pueden utilizar polímeros, tales como polietilenglicol, para obtener propiedades deseables de solubilidad, estabilidad, vida media y otras propiedades farmacéuticamente aceptables (Davis y otros, 1978, Enzyme Eng. 4, 169-173; Burnham y otros, 1994, Am. J. Hosp. Pharm. 51, 201-218). Entre los ejemplos representativos de componentes estabilizantes se incluyen polisorbato 80, L-arginina, polivinilpirrolidona, trehalosa y combinaciones de los mismos. Otros componentes estabilizantes especialmente adecuados en composiciones de base plasmídica incluyen hialuronidasa (que se cree que desestabiliza la matriz extracelular de las células huésped tal como se describe en el documento WO 98/53853), cloroquina, compuestos próticos, tales como propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, etanol, 1-metil L-2-pirrolidona o derivados de los mismos, compuestos apróticos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dietilsulfóxido, di-n-propilsulfóxido, dimetilsulfona, sulfolano, dimetilformamida, dimetilacetamida, tetrametilurea, acetonitrilo (véase el documento EP 890362), inhibidores de nucleasa, tales como actina G (WO 99/56784) y sales catiónicas, tales como magnesio (Mg^{2+}) (EP 998945) y litio (Li^+) (WO 01/47563) y cualquiera de sus derivados. La cantidad de sal catiónica en la composición de la presente invención varía preferentemente desde aproximadamente 0,1 mM hasta aproximadamente 100 mM y, aún más preferentemente, desde aproximadamente 0,1 mM hasta aproximadamente 10 mM. Entre los agentes aumentadores de la viscosidad se incluyen carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y dextrano. La composición también puede contener sustancias conocidas en la técnica para inducir la penetración o el transporte a través de la barrera sanguínea o la membrana de un órgano particular (por ejemplo, anticuerpo para un receptor de transferrina; Friden y otros, 1993, Science 259, 373-377). Se pueden utilizar un complejo en gel de poli-lisina y lactosa (Midoux y otros, 1993, Nucleic Acid Res. 21, 871-878) o poloxámero 407 (Pastore, 1994, Circulation 90, 1-517) para facilitar la administración en células arteriales.

La composición de la presente invención también puede comprender uno o más adyuvantes adecuados para la aplicación sistémica o por mucosa en humanos. Entre los ejemplos representativos de adyuvantes útiles se incluyen, sin limitación, alumbre, emulsión de aceites minerales, tales como completo e incompleto de Freund, lipopolisacárido o un derivado del mismo (Ribi y otros, 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins (Inmunología e Inmunofarmacología de Endotoxinas Bacterianas), Plenum Publ. Corp., NY, págs. 407-419), saponinas, tales como QS21 (Sumino y otros, 1998, J. Virol. 72, 4931-4939; WO 98/56415), Escina, Digitonina, Gypsophila o saponinas de Chenopodium quinoa. De manera alternativa, la composición de la presente invención se puede formular con vehículos para vacunas convencionales compuestos de quitosano u otros polímeros policatiónicos, partículas de poliláctido y poliláctido-co-glicólido, matriz de polímero de base poli-N-acetil glucosamina, partículas compuestas de polisacáridos o polisacáridos modificados químicamente, y partículas basadas en lípidos, etc. La composición se puede formular también en presencia de colesterol para formar estructuras particuladas, tales como liposomas.

La composición también se puede administrar a pacientes en una cantidad eficaz, especialmente para aumentar una respuesta inmune en un animal u organismo humano. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz para aumentar una respuesta inmune podría ser aquella cantidad necesaria para provocar la activación del sistema inmune, por ejemplo, dando lugar al desarrollo de una respuesta antitumoral en un paciente canceroso (por ejemplo, reducción del tamaño o regresión del tumor en el que se ha inyectado la composición y/o tumores distantes). La dosis apropiada puede variar dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente activo particular, edad, salud y peso del organismo huésped; la condición o condiciones patológicas a tratar, naturaleza y extensión de los síntomas, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia del tratamiento, necesidad de prevención o terapia y/o el efecto deseado. La dosis también se calculará dependiendo de la ruta de administración particular seleccionada. En función de las circunstancias pertinentes, el técnico realiza habitualmente un refinamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosis apropiada para el tratamiento. Como guía general, una composición basada en partículas virales (por ejemplo, adenovirales) se puede formular en forma de dosis entre 10^4 y

10¹⁴ iu (unidades infecciosas), de manera ventajosa entre 10⁵ y 10¹³ iu y preferentemente entre 10⁶ y 10¹² iu. El título se puede determinar mediante técnicas convencionales. Una composición basada en plásmidos de vector se puede formular en forma de dosis entre 1 µg y 100 mg, de manera ventajosa entre 10 µg y 10 mg y preferentemente entre 100 µg y 1 mg. Una composición basada en proteínas se puede formular en forma de dosis entre 10 ng y 100 mg. Una dosis preferente es de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg de la proteína terapéutica por kg de peso corporal. La administración puede tener lugar en una dosis individual o en una dosis repetida una o varias veces después de un cierto intervalo de tiempo. En una realización preferente, la composición de la presente invención se administra mediante inyección utilizando jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para la liberación balística de composiciones sólidas (documento WO 99/27961) o un dispositivo por chorro líquido a presión sin aguja (documentos US 4.596.556; US 5.993.412).

La composición de la presente invención se puede envasar en ampollas, jeringas desechables o viales para dosis múltiples fabricados de vidrio o plástico. En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida de modo que sea fácil su administración con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del agente activo (por ejemplo, una proteína de fusión o partículas infecciosas) en la cantidad requerida con un ingrediente indicado anteriormente, o una combinación de los mismos, seguido de una esterilización filtrada.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar en métodos para tratar o prevenir un conjunto de enfermedades y condiciones patológicas, incluyendo enfermedades genéticas, enfermedades congénitas y enfermedades adquiridas, tales como enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones virales y/o bacterianas), cáncer, enfermedades de inmunodeficiencia y enfermedades autoinmunes. Por consiguiente, la presente invención también comprende la utilización de la proteína de fusión, vector, partícula viral infecciosa, célula huésped o composición de la presente invención para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento o prevención de dichas enfermedades y, de manera especial, el cáncer o una enfermedad infecciosa.

La composición de la presente invención está particularmente destinada al tratamiento preventivo o curativo de trastornos, condiciones patológicas o enfermedades asociadas con el cáncer. El término "cáncer" comprende cualquier condición patológica cancerosa, incluyendo tumores difusos o localizados, metástasis, pólipos cancerosos y lesiones preneoplásicas (por ejemplo, displasias), así como enfermedades que resultan de la proliferación celular no deseada. Se pueden seleccionar un conjunto de tumores para el tratamiento según los métodos descritos en la presente invención. En general, son preferentes los tumores sólidos. Entre los cánceres que se contemplan en el contexto de la presente invención se incluyen, sin limitación, glioblastoma, sarcoma, melanomas, mastocitoma, carcinomas, así como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer cervical (en particular, aquellos inducidos por el virus del papiloma), cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinomas de pulmón, incluyendo de célula grande, de célula pequeña, escamoso y adenocarcinoma), cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer anal, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer de la cavidad oral, cáncer de laringe, cáncer de cerebro y SNC, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma y no melanoma), cáncer de sangre (linfomas, leucemia, especialmente si se han desarrollado en masa sólida), cáncer de hueso, retinoblastoma y cáncer de tiroides. En una realización preferente de la utilización de la presente invención, la composición se administra en un tumor sólido o próximo al mismo.

También se contemplan otras enfermedades y condiciones patológicas en el contexto de la presente invención, especialmente enfermedades infecciosas asociadas con una infección por un patógeno, tal como hongos, bacterias, protozoos y virus. Entre los ejemplos representativos de patógenos virales se incluyen, sin limitación, el virus de inmunodeficiencia humana (por ejemplo, VIH-1 o VIH-2), virus de herpes humano (por ejemplo, HSV1 o HSV2), citomegalovirus, Rotavirus, virus de Epstein Barr (EBV), virus de hepatitis (por ejemplo, virus de hepatitis B, virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E), virus de varicela-zóster (VZV), paramixovirus, coronavirus; virus respiratorio sincitial, virus paragripal, virus del sarampión, virus de las paperas, flavivirus (por ejemplo, el virus de la fiebre amarilla, el virus del Dengue, el virus de la encefalitis transmitida por garrapata, el virus de la encefalitis japonesa), virus de la gripe y, preferentemente, el virus del papiloma humano (por ejemplo, HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33). Entre los ejemplos representativos de patógenos bacterianos se incluyen Neisseria (por ejemplo N. gonorrhoea y N. meningitidis); Bordetella (por ejemplo, B. pertussis, B. parapertussis y B. bronchiseptica), Mycobacteria (por ejemplo, M. tuberculosis, M. bovis, M. leprae, M. avium, M. paratuberculosis, M. smegmatis); Legionella (por ejemplo, L. pneumophila); Escherichia (por ejemplo, E. coli enterotóxica, E. coli enterohemorrágica, E. coli enteropatógena); Vibrio (por ejemplo, V. cholera); Shigella (por ejemplo, S. sonnei, S. dysenteriae, S. flexnerii); Salmonella (por ejemplo, S. typhi, S. paratyphi, S. choleraesuis, S. enteritidis); Listeria (por ejemplo, L. monocytogenes); Helicobacter (por ejemplo, H. pylori); Pseudomonas (por ejemplo, P. aeruginosa); Staphylococcus (por ejemplo, S. aureus, S. epidermidis); Enterococcus (por ejemplo, E. faecalis, E. faecium), Clostridium (por ejemplo, C. tetani, C. botulinum, C. difficile); Bacillus (por ejemplo, B. anthracis); Corynebacterium (por ejemplo, C. diphtheriae), y Chlamydia (por ejemplo, C. trachomatis, C. pneumoniae, C. psittaci). Entre los ejemplos representativos de patógenos parásitos se incluyen Plasmodium (por ejemplo, P. falciparum), Toxoplasma (por ejemplo, T. gondii), Leshmania (por ejemplo, L. major), Pneumocystis (por ejemplo, P. carinii), Trichomonas (por ejemplo, T. vaginalis), Schistosoma (por ejemplo, S. mansoni). Entre los ejemplos representativos de hongos se incluyen Candida (por ejemplo, C. albicans) y Aspergillus.

Entre los ejemplos de enfermedades autoinmunes se incluyen, pero sin limitación a éstas, esclerosis

múltiple (MS), escleroderma, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune, diabetes mellitus, colitis ulcerosa, Myasthenia gravis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, trombocitopenia púrpura idiopática, anemia hemolítica, miositis múltiple/dermatomiositis, enfermedad de Hashimoto, hipocitosis autoinmune, síndrome de Sjogren, síndrome de angitis y enfermedades autoinmunes inducidas por fármacos (por ejemplo, lupus inducido por fármaco).

5 Además, tal como se ha mencionado anteriormente, la proteína de fusión, la molécula de ácido nucleico, el vector, la partícula infecciosa, la célula huésped para la utilización según la presente invención y/o la composición de la presente invención se pueden utilizar como adyuvante para aumentar la respuesta inmune de un animal u organismo humano a un antígeno particular. Esta utilización particular de la presente invención se puede realizar en combinación con uno o más transgenes o productos de transgenes tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, para fines de inmunoterapia. Preferentemente, el agente activo (por ejemplo, la proteína de fusión, la partícula infecciosa o composición farmacéutica de la presente invención) se administra en combinación con uno o más transgenes o productos de transgenes. Por consiguiente, también se da a conocer preferentemente una composición que comprende en combinación un producto de transgén (por ejemplo, un antígeno viral o un producto génico suicida) y una proteína de fusión, así como una composición que comprende el vector o vectores o partículas virales que codifican un producto de transgén y una proteína de fusión. El transgén y las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de fusión se pueden expresar a partir del mismo vector o a partir de vectores separados que pueden tener el mismo origen (por ejemplo, vectores adenovirales) o un origen diferente (por ejemplo, un vector MVA que codifica el antígeno particular y un vector adenoviral que codifica la proteína de fusión). La proteína de fusión y el producto de transgén (o sus respectivos vectores codificantes) se pueden introducir en la célula u organismo huésped de manera concomitante o secuencial a través de la mucosa y/o una ruta sistémica.

Una combinación preferente en el contexto de la presente invención utiliza una composición que comprende o codifica (i) una proteína de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en cualquiera de la SEC ID No: 8 a 15, y (ii) un antígeno de HPV (particularmente preferente en este contexto es un antígeno temprano no oncogénico y anclado a la membrana de HPV-16). Por ejemplo, se puede tratar un organismo huésped con un vector que expresa la proteína de fusión de la presente invención y con una variante E7 de HPV-16 no oncogénica y anclada a la membrana o un vector que la expresa. De manera alternativa, se puede tratar un organismo huésped con la proteína de fusión de la presente invención y con una variante E7 de HPV-16 no oncogénica y anclada a la membrana o un vector que la expresa. Preferentemente, la proteína de fusión de la presente invención es codificada por un vector adenoviral y el antígeno de HPV por un vector MVA. En este aspecto, el vector adenoviral que codifica la proteína de fusión de la presente invención se administra inicialmente en el organismo huésped y el vector de MVA que codifica el antígeno de HPV inmunogénico se administra posteriormente al mismo organismo huésped después de un período que varía de un día a dos meses. El vector adenoviral que codifica la proteína de fusión se administra preferentemente mediante la ruta mucosal, mientras que el vector de MVA se inyecta mediante ruta subcutánea. Las composiciones que comprenden un vector único que contiene las secuencias que codifican tanto la proteína de fusión como la variante E7 de HPV-16 no oncogénica y anclada a la membrana también se pueden prever en este contexto. Las vacunas de refuerzo con el antígeno particular o un vector que lo expresa también se pueden aplicar desde aproximadamente 2 semanas a varios años después de la administración original.

Otra combinación preferente en el contexto de la presente invención utiliza (i) una proteína de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en cualquiera de las SEC ID NO: 8 a 15 o un vector que la codifica y (ii) un vector que codifica el producto génico FCU-1 (fusión CDasa-UPRTasa que se describe en el documento W099/54481). Preferentemente, la proteína de fusión de la presente invención es codificada por un vector adenoviral y el producto génico FCU-1 por un vector de MVA. En este aspecto, ambos vectores se pueden administrar de manera simultánea o secuencial en un período de tiempo corto en el organismo huésped, por ejemplo, mediante inyección intratumoral. A continuación, se administra el profármaco 5-FC al organismo huésped en el día o la semana siguiente a la administración de ambos vectores. La presente invención también da a conocer la utilización de la proteína de fusión, el vector, la partícula viral infecciosa, la célula huésped o la composición de la presente invención para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento o prevención del cáncer o una enfermedad infecciosa. Tal como se utiliza en la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una dosis suficiente para el alivio de uno o más síntomas asociados normalmente con la enfermedad o condición patológica deseada a tratar. Cuando se refiere a la utilización profiláctica, este término significa una dosis suficiente para evitar o retrasar el establecimiento de una enfermedad o condición patológica.

La utilización de la presente invención puede ser para fines preventivos y para aplicaciones terapéuticas relativas a las enfermedades o condiciones patológicas indicadas anteriormente. Debe entenderse que la presente utilización se puede llevar a cabo mediante un conjunto de estrategias. Para este objetivo, la proteína de fusión, el vector, la partícula viral infecciosa, la célula huésped o la composición de la presente invención, se pueden administrar directamente *in vivo* mediante cualquier ruta de administración convencional y fisiológicamente aceptable, tal como las mencionadas anteriormente, utilizando medios de liberación específicos adaptados a esta ruta de administración. Podría ser ventajoso proceder a la administración del agente activo después de un incremento de la permeabilidad de un vaso sanguíneo. Dicho aumento de la permeabilidad se puede obtener mediante el aumento de la presión hidrostática (es decir, obstruyendo el flujo de salida y/o entrada), la presión osmótica (es decir, con una solución hipertónica) y/o mediante la utilización de fármacos apropiados (por ejemplo, histamina; documento WO 98/58542).

De manera alternativa, se pueden utilizar células eucariotas que se han diseñado *ex vivo* para que

contengan el agente activo según la presente invención. Las células transfectadas/infectadas se desarrollan *in vitro* y, a continuación, se reintroducen en el paciente. El injerto de células huésped encapsuladas también es posible en el contexto de la presente invención (Lynch y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1138-1142). Las células infectadas *ex-vivo* también pueden ser células autólogas o células heterólogas, por ejemplo, células heterólogas obtenidas de un sujeto o un conjunto de sujetos con una condición patológica similar a la que debe tratarse. Las células pueden ser de un tipo de célula individual o de una mezcla de tipos de células, por ejemplo, pueden comprender células de una línea celular o de varias líneas celulares establecidas a partir de las muestras de tumores clínicas. Preferentemente, las células para la administración se pueden inactivar, por ejemplo, mediante radiación, antes de la administración. Entre las células que se pueden tratar de manera útil de esta manera se encuentran, por ejemplo, las células malignas de organismos humanos o no humanos (véase, R Jurecic y otros, capítulo 2, págs. 7-30 en "Somatic Gene Therapy" (Terapia Génica Somática"), CRC Press 1995, ed. P. L. Chang).

La eficacia del agente activo o composición de la presente invención para aumentar la respuesta inmune en un animal u organismo humano se puede analizar de varias maneras, incluyendo, pero sin limitarse a éstas, la detección de inmunidad celular en el organismo tratado, la determinación de la actividad de los linfocitos o células dendríticas, la detección de los niveles de inmunoglobulina, la determinación de la actividad de células presentadoras de antígeno, la determinación del desarrollo de células dendríticas o la estimulación del organismo tratado con un agente infeccioso o inductor de tumores apropiado para determinar si el organismo tratado es resistente a la enfermedad. En una realización, las composiciones terapéuticas se pueden analizar en modelos animales, tales como ratones. Dichas técnicas son conocidas por los expertos en la materia.

Tal como se ha descrito anteriormente, la utilización de la presente invención está particularmente destinada al tratamiento de cánceres, para conseguir la inhibición del crecimiento del tumor o la regresión del tumor. Por ejemplo, la inhibición del tumor se puede determinar midiendo el tamaño real del tumor durante un periodo de tiempo. De manera más específica, para estimar el tamaño del tumor se pueden utilizar un conjunto de métodos radiológicos de obtención de imágenes (por ejemplo, tomografía computerizada de emisión de fotón único y positrones; véase, en general, "Nuclear Medicine in Clinical Oncology," (Medicina Nuclear en Oncología Clínica," Winkler, C. (ed.) Springer-Verlag, Nueva York, 1986). Dichos métodos pueden utilizar también un conjunto de agentes para la obtención de imágenes, por ejemplo, agentes para la obtención de imágenes convencionales (por ejemplo, citrato de galio-67), así como reactivos especializados para la obtención de imágenes de metabolitos o receptores, o la obtención de imágenes inmunológicas (por ejemplo, anticuerpo monoclonal radiomarcado dirigido a marcadores tumorales específicos). Además, para estimar el tamaño de un tumor también se pueden utilizar métodos no radioactivos, tales como ultrasonidos (véase, "Ultrasonic Differential Diagnosis of Tumors" (Diagnóstico Diferencial Ultrasónico de Tumores"), Kossoff y Fukuda, (eds.), Igaku-Shoin, Nueva York, 1984). De manera alternativa, la inhibición del crecimiento del tumor se puede determinar en base a un cambio en la presencia de un marcador tumoral. Entre los ejemplos se incluyen PSA para la detección del cáncer de próstata y CEA para la detección de cánceres colorrectales y ciertos cánceres de mama. Para otro tipo de cánceres, tales como leucemia, la inhibición del crecimiento del tumor se puede determinar en base al descenso en el número de células leucémicas en un recuento de células sanguíneas representativas.

La validación posterior de la eficacia terapéutica del agente activo de la presente invención para el tratamiento del cáncer se puede determinar en un modelo animal adecuado, por ejemplo, utilizando ratones inyectados con una línea celular de cáncer humano representativa. Después de desarrollar los tumores sólidos hasta un diámetro medible, los ratones son inyectados de manera intravenosa o intratumoral con el agente activo y, a continuación, se controla la reducción de la velocidad de crecimiento del tumor y el aumento de la supervivencia (véase el ejemplo 4).

La prevención o tratamiento de una enfermedad o una condición patológica se pueden llevar a cabo utilizando la presente utilización sola o, si se desea, conjuntamente con modalidades terapéuticas actuales o convencionales (por ejemplo, radiación, quimioterapia y/o cirugía). La utilización de múltiples estrategias terapéuticas proporciona al paciente una intervención de base más amplia. En una realización, el tratamiento con un agente activo según la presente invención puede estar precedido de intervención quirúrgica. En otra realización, se utiliza radioterapia (por ejemplo, radiación gamma) en combinación con los agentes activos según la presente invención. Los expertos en la materia pueden formular fácilmente protocolos de terapia por radiación apropiados y los parámetros que se pueden utilizar en la utilización de la presente invención (véase, por ejemplo, Perez y Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology (Principios y Práctica de la Oncología por Radiación), 2ª Ed. JB Lippincott Co; utilizando las adaptaciones y modificaciones apropiadas tal como será fácilmente evidente para los expertos en la materia). Preferentemente, el agente activo de la presente invención se administra antes de la exposición del individuo a una cantidad terapéuticamente eficaz de radiación anticancerosa. En otra realización, la utilización de la presente invención está asociada a la quimioterapia. La quimioterapia incluye la administración de agentes citotóxicos y/o citostáticos que se pueden disponer en una dosis individual o, de manera alternativa, en dosis múltiples que se administran durante varias horas, días y/o semanas. Los agentes quimioterapéuticos se liberan según los protocolos estándar utilizando agentes, dosis y regímenes estándar y su administración puede preceder, o ser simultánea, o posterior a la administración del agente activo de la presente invención. Entre los agentes quimioterapéuticos adecuados se incluyen, sin limitación, cisplatino, carboplatino, doxirrubicina, bleomicina, vinblastina, danurrubicina, tamoxifeno, taxol, 5-FU y metotrexato. En algunas realizaciones, los tratamientos con quimioterapia y radiación se utilizan antes o después de la administración del agente activo de la presente invención.

Cuando en la utilización de la presente invención se utiliza un vector, partícula infecciosa, célula

huésped o composición diseñados para expresar un transgén que codifica un producto génico suicida, puede ser ventajoso administrar de manera adicional una cantidad farmacéuticamente aceptable de un profármaco que es específico para el producto génico suicida expresado. Las dos administraciones se pueden realizar de manera simultánea o consecutiva, pero preferentemente el profármaco se administra después del agente activo de la presente invención. A modo de ilustración, es posible utilizar una dosis de profármaco desde 50 a 500 mg/kg/día, siendo preferente una dosis de 200 mg/kg/día. El profármaco se administra según la práctica estándar. Es preferente la ruta oral. Es posible administrar una dosis individual de profármaco o una dosis que se repite durante un tiempo suficientemente largo que permita que se produzca el metabolito tóxico en el organismo o célula huésped. Tal como se ha mencionado anteriormente, se pueden utilizar los fármacos ganciclovir o aciclovir en combinación con el producto génico de TK HSV-1 y 5-FC en combinación con los productos génicos de citosina desaminasa y/o uracil fosfotransferasa.

La presente invención también se refiere a una utilización de la proteína de fusión, el vector, las partículas infecciosas, las células huésped o la composición de la presente invención, para aumentar una respuesta inmune.

La respuesta inmune puede ser una respuesta específica y/o no específica, humoral y/o mediada por células. De manera específica, la respuesta inmune es una respuesta de las células T y, de manera más específica, una respuesta de las células T citotóxicas. Preferentemente, la utilización de la presente invención permite aumentar el número y/o la actividad citolítica de CTL específicos para un antígeno seleccionado. La introducción se realiza preferentemente de manera subcutánea, intradérmica, intramuscular, intranasal, intratumoral o cerca del tumor. En una realización preferente, la utilización de la presente invención se refiere al aumento de una respuesta inmune específica de antígeno en una célula u organismo huésped, mediante la utilización de un agente activo que comprende o expresa un producto de transgén que consiste en uno o más antígenos específicos contra los que se desea una respuesta inmune específica (por ejemplo, las variantes E6 o E7 de HPV-16). En otra realización, la utilización de la presente invención se refiere al aumento de una respuesta inmune específica de antígeno en una célula u organismo huésped, mediante la utilización de un agente activo que comprende o expresa un transgén que consiste en uno o más antígenos asociados a tumor o específicos de tumor presentes en un tumor, a efectos de inhibir el crecimiento o evitar el recrecimiento de cualquier tumor que tenga dicho antígeno.

La presente invención también da a conocer la utilización de la proteína de fusión, el vector, las partículas infecciosas, las células huésped o la composición de la presente invención, para la preparación de un fármaco destinado al objetivo de activar la maduración de células dendríticas en un organismo animal o humano y, de este modo, aumentar una respuesta inmune no específica contra antígenos tumorales o virales. En una realización preferente, esta utilización está destinada a la prevención o el tratamiento de una enfermedad que se puede revertir mediante la activación de la maduración de células dendríticas. El aumento de la maduración de las células dendríticas se puede evaluar tal como se ilustra en el ejemplo 2. En una realización preferente, la proteína de fusión para esta utilización es IL-2/IL-18 (con una preferencia especial por las proteínas de fusión IL-2/proIL-18 e IL-2/proIL-18 (K89A) mostradas).

La presente invención también da a conocer la utilización de la proteína de fusión, el vector, las partículas infecciosas, las células huésped o la composición de la presente invención, para la preparación de un fármaco destinado al objetivo de activar células NKT en un organismo animal o humano y, de este modo, aumentar una respuesta inmune no específica contra antígenos tumorales o virales. En una realización preferente, esta utilización está destinada a la prevención o el tratamiento de una enfermedad, tal como cáncer y una enfermedad infecciosa, que se pueden revertir mediante la activación de las células NKT. El aumento de la activación de las células NKT se puede evaluar tal como se ilustra en el ejemplo 2. En una realización preferente, la proteína de fusión para esta utilización es IL-2/IL-18 (con una preferencia especial por las proteínas de fusión IL-2/proIL-18 e IL-2/proIL-18 (K89A) mostradas).

La presente invención también da a conocer la utilización de la proteína de fusión, el vector, las partículas infecciosas, las células huésped o la composición de la presente invención, para la preparación de un fármaco que proporciona una citotoxicidad inferior después de la administración en un organismo animal o humano en comparación con la citotoxicidad observada después de la administración de los grupos X y/o Y individuales. Una citotoxicidad limitada es especialmente ventajosa para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas, tales como las citadas anteriormente. Se puede evaluar mediante la medición de la actividad AICD o VLS (Síndrome de Pérdida Vasculare), tal como se ilustra en el ejemplo 3. En una realización preferente, la proteína de fusión para esta utilización es IL-2/IL-18 (con una preferencia especial por las proteínas de fusión IL-2/proIL-18 e IL-2/proIL-18 (K89A) mostradas).

También se dan a conocer anticuerpos que se unen selectivamente a la proteína de fusión de la presente invención o fragmentos peptídicos de los mismos. Tal como se utiliza en la presente invención, un anticuerpo se une selectivamente a un péptido diana cuando se une al péptido diana y no se une de manera significativa a proteínas no relacionadas. En ciertos casos, se entenderá que la unión de los anticuerpos al péptido es aún selectiva a pesar de cierto grado de reactividad cruzada.

Tal como se utiliza en la presente invención, un anticuerpo se define en términos consistentes con lo que se conoce en la técnica. Entre los anticuerpos se incluyen anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, así

como fragmentos de dichos anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a éstos, fragmentos Fab o F(ab').sub.2, y Fv.

Se conocen muchos métodos para generar y/o identificar anticuerpos para un polipéptido/péptido diana determinado. En Harlow (1989, *Antibodies (Anticuerpos)*, Cold Spring Harbor Press) se describen varios de dichos métodos. Un método preferente para producir anticuerpos incluye (a) administrar a un animal una cantidad eficaz de una proteína de fusión de la presente invención y/o un fragmento peptídico de la misma, para producir los anticuerpos y (b) recuperar los anticuerpos. En otro método, los anticuerpos de la presente invención se producen de manera recombinante utilizando técnicas convencionales del sector. Se pueden utilizar una proteína de fusión de longitud completa o un fragmento peptídico antigénico. Los anticuerpos se preparan preferentemente a partir de regiones o fragmentos discretos de las proteínas secretadas. Son particularmente importantes las regiones y fragmentos que comprenden secuencias únicas de las proteínas de fusión de la presente invención, tales como las que solapan en el sitio de fusión los grupos X e Y. Un fragmento antigénico comprenderá habitualmente, como mínimo, 8 residuos de aminoácidos contiguos. Sin embargo, el fragmento antigénico puede comprender, como mínimo, 10, 12, 14, 16 o más residuos de aminoácidos.

Los anticuerpos presentan un conjunto de utilidades potenciales.

Por ejemplo, dichos anticuerpos se pueden utilizar (a) como reactivos en pruebas para detectar una proteína de fusión de la presente invención (b) como reactivos en pruebas para modular la actividad celular a través de una proteína de fusión de la presente invención, y/o (c) como herramientas para recuperar una proteína de fusión de la presente invención, a partir de una mezcla de proteínas y otros contaminantes. La utilización de un anticuerpo como reactivo se puede facilitar mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) del anticuerpo a una sustancia detectable. Entre los ejemplos de sustancias detectables se incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa. Entre los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Entre los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamin fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Entre los ejemplos de materiales bioluminiscentes se incluyen luciferasa, luciferina y aequorina. Entre los ejemplos de material radioactivo adecuado se incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Los anticuerpos se pueden utilizar para aislar una de las proteínas de fusión de la presente invención mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Los anticuerpos pueden facilitar la purificación a partir de las células cultivadas de la proteína de fusión producida de manera recombinante. Además, dichos anticuerpos se pueden utilizar para detectar la proteína *in situ*, *in vitro* o en un lisado celular o sobrenadante a efectos de evaluar la abundancia y patrón de expresión. Además, dichos anticuerpos son útiles para detectar la presencia o para evaluar la expresión de una de las proteínas de fusión de la presente invención en células, muestras biológicas o tejidos de un individuo durante la evolución de un tratamiento. De manera adicional, dichos anticuerpos se pueden utilizar para identificar individuos que requieren de modalidades modificadas de tratamiento. Estas utilidades también se pueden aplicar en un contexto terapéutico en el que el tratamiento implica la inhibición de la función de la proteína de fusión de la presente invención.

La presente invención se ha descrito de manera ilustrativa y debe entenderse que la terminología que se ha utilizado pretende estar en concordancia con las palabras de la descripción, en lugar de ser una limitación. Obviamente, a la luz de las enseñanzas anteriores son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención. Por lo tanto, debe entenderse que dentro del alcance de las reivindicaciones que se acompañan, la presente invención se puede realizar de una manera diferente a lo que se describe específicamente en esta memoria.

Leyendas de las figuras

La figura 1 muestra las etapas de construcción esquemáticas para generar un vector adenoviral que codifica una proteína de fusión.

La figura 2 muestra la evaluación *in vitro* de la funcionalidad de proteínas de fusión que contienen IL-2 mediante la medición de la coestimulación de células T. "Espleno" representa esplenocitos, "ConA" representa esplenocitos activados con Concanavalina A, "Anti-CD3" representa esplenocitos activados con un anticuerpo específico de CD3 murino, y "1/2" y "1/10" representan las diluciones de los sobrenadantes virales utilizados en esta prueba. "Ad vacío" representa un control negativo carente de secuencias que codifican la proteína de fusión.

La figura 3 muestra la evaluación *in vitro* de la funcionalidad de proteínas de fusión que contienen IL-7 mediante la medición de la proliferación de células linfoblastos pro-B-2E8. "rMu IL-7" representa la IL-7 murina recombinante (1 a 500 ng/ml), "p" representa sobrenadantes virales puros y "1/2" y "1/10" representan las diluciones de los sobrenadantes virales utilizados en esta prueba.

La figura 4 muestra la evaluación *in vitro* de la funcionalidad de proteínas de fusión que contienen IL-18 mediante la medición de la inducción de la secreción de IFN-g por esplenocitos murinos preactivados con ConA (Concanavalina A 10 µg/ml; 24 h). La producción de IFN-g se evalúa mediante inmunoensayos ELISA. "1/20" y "1/50" representan las diluciones de los sobrenadantes virales utilizados en esta prueba. IL-18 representa aquí proIL-18.

5 La figura 5 muestra la activación *in vitro* de esplenocitos. El análisis de la secreción de IFN γ inducida por esplenocitos cebados con ConA (10 μ g/ml) o no cebados por los sobrenadantes A549 que contienen 20 ng/ml de mproIL-18 (K89A), la combinación de mL-2+mproIL-18 (K89A), mL-2/IL-18 madura (Ad-mIL-2/IL-18), mL-2/IL-18 madura (K89A) (Ad-mIL-2/IL-18*), mL-2/proIL-18 y mL-2/proIL-18 (K89A). Como control negativo, se utilizaron células A549 de control infectadas con el virus. Estos resultados son representativos de tres experimentos diferentes con resultados similares. IL-18* representa IL-18 (K89A).

10 La figura 6 muestra el análisis *in vivo* de la toxicidad sistémica de citoquinas de fusión y la toxicidad celular. La valoración del síndrome VLS inducido por el tratamiento i.v. de ratones con 2.10^9 iu de un Ad vacío (a), Ad-mIL-2 (b), Ad-mproIL-18 (K89A) (c), la combinación de Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A) (b+c), Ad-mIL-2/IL-18 madura (K89A) (d) y Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) (e).

La figura 7 muestra el efecto inmunoadyuvante de Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) en combinación con MVA-E7. Al igual que antes, * representa la mutación (K89A).

La figura 8 muestra el efecto inmunoadyuvante de Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) en combinación con MVA-FCU1. Al igual que antes, * representa la mutación (K89A).

15 La figura 9 muestra la actividad antitumoral después de tres inyecciones intratumorales de Ad que expresan las proteínas de fusión que contienen IL-15 en ratones que tienen los tumores B16F10. G1 representa el tratamiento con un vector Ad que no expresa el transgén (Ad vacío), G2 representa el tratamiento con un vector Ad que expresa la citoquina IL-15 murina madura equipado en su extremo N-terminal con el péptido señal de IL-2 (Ad-mIL-15), G6 representa el tratamiento con un vector Ad que expresa la fusión entre la citoquina IL-15 murina madura equipada en su extremo N-terminal con el péptido señal de IL-2 y la IL-7 murina (Ad-mIL-15/mIL-7). G7 representa el tratamiento con un vector Ad que expresa la fusión entre la citoquina IL-21 murina y la IL-15 murina madura (Ad-mIL-21/mIL-15). G10 representa el tratamiento con un vector Ad que expresa la fusión entre la citoquina IL-15 murina madura equipada en su extremo N-terminal con el péptido señal de IL-2 y la variante K89A de proIL-18 murino (Ad-mIL-15/proIL-18*).

25 La figura 10 representa la inyección intratumoral de adenovirus que codifica nuevas versiones mejoradas de IL-15 en ratones que tienen los tumores B16F10. G1 representa el tratamiento con un vector Ad que no expresa el transgén (Ad vide), G2 representa el tratamiento con un vector Ad que expresa la citoquina IL-15 murina madura equipada en su extremo N-terminal con el péptido señal de IL-2 (Ad-mIL-15 o Ad-spl2-IL-15). G3 representa el tratamiento con un vector Ad que expresa la citoquina IL-15 murina madura equipada en su extremo N-terminal con el péptido señal de cadena ligera kappa de IgG (Ad-spvKL-IL-15). G4 representa

30 el tratamiento con un vector Ad que expresa la citoquina IL-15 murina madura equipada con el péptido señal endógeno de forma larga (Ad-spLSP-IL-15). G5 representa el tratamiento con un vector Ad que expresa la citoquina IL-15 murina madura equipada con el péptido señal endógeno de forma corta y empalme "splice" (Ad-spLSP-IL-15 empalme).

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención.

EJEMPLOS

35 Las construcciones descritas a continuación se preparan según las técnicas generales de ingeniería genética y de clonación molecular, tal como se detalla en Sambrook y otros (2001, Molecular Cloning; A Laboratory Manual (Clonación Molecular; Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY) o según las recomendaciones del fabricante cuando se utiliza un kit comercial. Las etapas de la clonación que utilizan plásmidos bacterianos se llevan a cabo preferentemente en la cepa 5K de *E. coli* (Hubacek y Glover, 1970, J. Mol. Biol. 50, 111-127) o en la cepa BJ5183 de *E. coli* (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). Esta última cepa se utiliza preferentemente para las etapas de recombinación homóloga. La cepa NM522 (Stratagene) es adecuada para la propagación de los vectores de fagos M13. Las técnicas de amplificación por PCR son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, PCR Protocols - A guide to methods and applications (Protocolos de PCR - Una guía para métodos y aplicaciones), 1990; Ed Innis, Gelfand, Sninsky y White, Academic Press Inc). Con respecto a la reparación de los sitios de restricción, la técnica utilizada consiste en rellenar los extremos 5' salientes utilizando el fragmento grande de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Klenow). Las secuencias de nucleótidos de Ad5 son las descritas en la base de datos del Banco de Genes bajo las referencias M73260 o AY339865.

Materiales y métodos

Clonación y construcción de ADNc de citoquinas multifuncionales

50 Se recogieron esplenocitos de ratones C57B16 y se estimularon durante 3 días con una mezcla de concanavalina A (10 μ g/ml, SIGMA) e IL-2 murina (10 IU/ml, R&D Systems) o LPS (10 μ g/ml, SIGMA) y GM-CSF murino (50 IU/ml, R&D Systems). A continuación, se extrajo el ARNm de los esplenocitos activados utilizando RNA Now (Ozyme). Se amplificaron los ADNc de IFN-g, IL-2, IL-7, IL-15, IL-18 e IL-21 murinas mediante RT-PCR (Platinum Quantitative RT-PCR (RT-PCR Cuantitativo de Platino), sistema de una etapa ThermoScript™, Invitrogen) utilizando oligonucleótidos específicos basados en los datos de secuencias disponibles en bancos de datos especializados. Las formas mutadas de IL-2 murina (D20I, N88R, N88G y Q126M) y la forma mutada de IL-18 murina (K89A) se produjeron

- utilizando el Kit de Mutagénesis Dirigida de Sitio QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Se utilizaron dos formas de ADNc de IL-18 murina para las moléculas de fusión, una que codificaba el precursor pro-IL-18 y otra que codificaba la IL-18 murina madura (carente de la prosequencia). La IL-15 secretable murina se describe en Fehniger y otros (2001, J. Exp. Med. 193, 219-231) y Suzuki y otros (2001, Leuk. Biol. 69, 531-537). Los siguientes oligonucleótidos se utilizaron para clonar y mutar las secuencias de citoquinas:
- 5 IL-2 murina
 5': otg14157 cggaattccacagtgacctcaagtcc (SEC ID NO: 20)
 3': otg14158 ggggtacccttatgtgtgtaag (SEC ID NO: 21)
- IL-2 murina (N88G)
 10 5': otg15485 gagaatttcatcagcggatcagagtaactgtg (SEC ID NO: 22)
 3': otg15486 caacagtactctgataccgctgatgaaattctc (SEC ID NO: 23)
- IL-2 murina (N88R)
 5': otg15487 gagaatttcatcagccgtatcagagtaactgtg (SEC ID NO: 24)
 3': otg15488 caacagtactctgataccgctgatgaaattctc (SEC ID NO: 25)
- 15 IL-2 murina (Q126M)
 5': otg15489 ggagatggatagccttctgtatgagcatcatctcaacaagccc (SEC ID NO: 26)
 3': otg15490 gggcttggatgatgctcacaagaaggctatccatctcc (SEC ID NO: 27)
- IL-2 murina (D20I)
 5': otg15536 gagcagctgttgatgatcctacaggag (SEC ID NO: 28)
 20 3': otg15537 ctctgtaggatcatcaacagctgctc (SEC ID NO: 29)
- IL-7 murina
 5': otg14438 ccgctcgagcggatgttccatgtttcttttagata (SEC ID NO: 30)
 3': otg14439 cggggtaccccggtatatactgcccttcaaat (SEC ID NO: 31)
- IL-18 murina
 25 5': otg14440 ccgctcgagcggatggctgccatgcagaaga (SEC ID NO: 32)
 3': otg14441 cggggtaccccgctaactttgatgtaagttagtgagagtgaac (SEC ID NO: 33)
- IL-18 murina (K89A)
 5': otg14457 ccagactgataatatacatgtacgcagacagtgaagtaagagg (SEC ID NO: 34)
 3': otg14458 cctcttactcactgtctgcgtacatgtatattatcagtctgg (SEC ID NO: 35)
- 30 IL-18 madura murina (sin prosequencia)
 5': otg14657 ggtggaggcgggtcaggcggagggtggcttaactttggccgacttactg (SEC ID NO: 36)
 3': otg14656 ctaactttgatgtaagttagtgagagtgaac (SEC ID NO: 37)
- IL-21 murina
 5': otg14436 ccgctcgagcggatggagaggacccttgtctg (SEC ID NO: 38)
 35 3': otg14437 cggggtaccccgctaggagatgctgatgaatcatc (SEC ID NO: 39)
- IL-15 murina
 5': otg15138 ccgctcgagcggatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 40)
 3': otg1513 cggggtaccccgctacttgcctcgtctcc (SEC ID NO: 41)

Tal como se describe en la figura 1, una vez amplificadas mediante RT-PCR, las secuencias que codifican los dos grupos de citoquinas (X e Y) se clonaron en el marco de lectura mediante técnicas de PCR con un enlazador flexible (G₄S)² o (G₄S)³ presentes entre ellos (Gillies y otros, 2002, Cancer Immunol. Immunother. 51, 449-460), utilizando los siguientes oligonucleótidos:

- 5 *IL-2/L/IL-18 murina
 5': otg14442 cgcctcgagcggatgtacagcatgcagctcga (SEC ID NO: 42)
 5'L: otg14444 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatggctgcatgtcagaaga (SEC ID NO: 43)
 3'L: otg14443 agagccacctccgcctgaaccgcctccaccttgaggcctgttgagatga (SEC ID NO: 44)
 3': otg14441 cggggtagcccgtaactttgatgtaagttagtgagagtgaaac (SEC ID NO: 33)
- 10 IL-18/L/IL-2 murina
 5': otg14440 cgcctcgagcggatggctgcatgtcagaaga (SEC ID NO: 32)
 5'L: otg14446 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcg (SEC ID NO: 45)
 3'L: otg14445 agagccacctccgcctgaaccgcctccacctttgatgtaagttagtgaga gtgaacat (SEC ID NO: 46)
 3': otg14447 cggggtagcccggtattgaggcctgttgag (SEC ID NO: 47)
- 15 IL-2/L/IL-18 madura murina (nativa o K89A)
 5': otg15657 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctaactttggccgacttactg (SEC ID NO: 48)
 3': otg15656 ctaactttgatgtaagttagtgagagtgaaac (SEC ID NO: 49)*IL-2/L/IL-7 murina
 5': otg14442 cgcctcgagcggatgtacagcatgcagctcga (SEC ID NO: 42)
 5'L: otg14449 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatgttccatgtttcttttag (SEC ID NO: 50)
 3'L: otg14443 agagccacctccgcctgaaccgcctccaccttgaggcctgttgagatga (SEC ID NO: 44)
 3': otg14439 cggggtagcccggtatatactgccttcaaaat (SEC ID NO: 31)
- 20 IL-7/L/IL-2 murina
 5': otg14438 cgcctcgagcggatgttccatgtttcttttagata (SEC ID NO: 30)
 5'L: otg14446 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcg (SEC ID NO: 45)
 3'L: otg14450 agagccacctccgcctgaaccgcctccacctatactgccttcaaaatt (SEC ID NO: 51)
 3': otg14447 cggggtagcccggtattgaggcctgttgag (SEC ID NO: 47)*IL-2/L/IL-21 murina
 5': otg14442 cgcctcgagcggatgtacagcatgcagctcga (SEC ID NO: 42)
 5'L: otg14448 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatggagaggacctgtctg (SEC ID NO: 52)
 3'L: otg14443 agagccacctccgcctgaaccgcctccaccttgaggcctgttgagatga (SEC ID NO: 44)
 3': otg14437 cggggtagcccgctaggagagatgctgatgaatcatc (SEC ID NO: 39)
- 30 IL-21/L/IL-2 murina
 5': otg14436 cgcctcgagcggatggagaggacctgtctg (SEC ID NO: 38)
 5'L: otg14446 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcg (SEC ID NO: 45)
 3'L: otg14451 agagccacctccgcctgaaccgcctccaccggagagatgctgatgaatcatc (SEC ID NO: 53)
 3': otg14447 cggggtagcccggtattgaggcctgttgag (SEC ID NO: 47)
- 35 *IL-2/L/IFN-g murina
 5': otg14442 cgcctcgagcggatgtacagcatgcagctcga (SEC ID NO: 42)
 5'L: otg14636 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatgaaccgctacactg

catcttgg (SEC ID NO: 54)

3'L: otg14443 agagccacctccgcctgaaccgcctccaccttgagggtgttgagatga (SEC ID NO: 44)

3': otg14637 cggggtaccccgctcagcagcagcactctttccg (SEC ID NO: 55)

IFN-g/L/IL-2 murina

5 5': otg14639 ccgctcgagcggatgaacgctacacactgcatcttgg (SEC ID NO: 56)

5'L: otg14446 ggtggaggcgggtcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcg (SEC ID NO: 45)

3'L: otg14641 agagccacctccgcctgaaccgcctccaccgcagcagcactctttccgc (SEC ID NO: 57)

3': otg14447 cggggtaccccggtattgagggtgttgag (SEC ID NO: 47)

*IL-2/L/IL-15 murina

10 5': otg14442 ccgctcgagcggatgtacagcatgcagctcga (SEC ID NO: 42)

5'L: otg15140 ggtggaggcgggtcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 58)

3'L: otg14443 agagccacctccgcctgaaccgcctccaccttgagggtgttgagatga (SEC ID NO: 44)

3': otg15139 cggggtaccccgctactgtcatcgtctcc (SEC ID NO: 41)

IL-15/L/IL-2 murina

15 5': otg15138 ccgctcgagcggatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 40)

5'L: otg14446 ggtggaggcgggtcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcg (SEC ID NO: 45)

3'L: otg15141 agagccacctccgcctgaaccgcctccacctgtcatcgtctccttg (SEC ID NO: 59)

3': otg14447 cggggtaccccggtattgagggtgttgag (SEC ID NO: 47)

*IL-7/L/IL-15 murina

20 5': otg14438 ccgctcgagcggatgtccatgtttcttttagata (SEC ID NO: 30)

5'L: otg15140 ggtggaggcgggtcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 58)

3'L: otg14450 agagccacctccgcctgaaccgcctccacctatactgccctcaaaatt (SEC ID NO: 51)

3': otg15139 cggggtaccccgctactgtcatcgtctcc (SEC ID NO: 41)

IL-15/L/IL-7 murina

25 5': otg15138 ccgctcgagcggatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 40)

5'L: otg14449 ggtggaggcgggtcaggcggagggtgctctatgttccatgtttcttttag (SEC ID NO: 50)

3'L: otg15141 agagccacctccgcctgaaccgcctccacctgtcatcgtctccttg (SEC ID NO: 59)

3': otg14439 cggggtaccccggtatatactgccctcaaaat (SEC ID NO: 31)

*IL-21/L/IL-15 murina

30 5': otg14436 ccgctcgagcggatggagaggacctgtctg (SEC ID NO: 38)

5'L: otg15140 ggtggaggcgggtcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 58)

3'L: otg14451 agagccacctccgcctgaaccgcctccaccggagagatgctgatgaatcatc (SEC ID NO: 53)

3': otg15139 cggggtaccccgctactgtcatcgtctcc (SEC ID NO: 41)

IL-15/L/IL-21 murina

35 5': otg15138 ccgctcgagcggatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 40)

5'L: otg14448 ggtggaggcgggtcaggcggagggtgctctatggagaggacctgtctg (SEC ID NO: 52)

3'L: otg15141 agagccacctccgcctgaaccgcctccacctgtcatcgtctccttg (SEC ID NO: 59)

3': otg14437 cggggtacccccgctagagagatgctgatgaatcatc (SEC ID NO: 39)

*IL-15/L/IL-18 murina (nativa o K89A)

5': otg15138 ccgctcgagcggatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 40)

5'L: otg14444 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatggctgcatgtcagaaga (SEC ID NO: 43)

5 3'L: otg15141 agagccacctccgctgaaccgcctccacccttgatcgtcgtccttg (SEC ID NO: 59)

3': otg14441 cggggtacccccgctaactttgatgtaagttagtgagagtgaac (SEC ID NO: 33)

IL-18 murina (nativa o K89A)/L/IL-15

5': otg14440 ccgctcgagcggatggctgcatgtcagaaga (SEC ID NO: 32)

5'L: otg15140 ggtggaggcgggttcaggcggagggtgctctatgtacagcatgcagctcgc (SEC ID NO: 58)

10 3'L: otg14445 agagccacctccgctgaaccgcctccaccctttgatgtaagttagtg

gagtgaacat (SEC ID NO: 46)

3': otg15139 cggggtacccccgctactgtcctcgtctcc (SEC ID NO: 41)

15 En cada caso, se construyeron ambos tipos de proteínas de fusión (X-Y e Y-X) y se analizaron sus actividades biológicas y terapéuticas. También se clonó cada citoquina individualmente en el mismo esqueleto adenoviral para servir como control.

Producción y titulación de adenovirus

20 La secuencia que codifica cada proteína de fusión se insertó en un plásmido lanzadera adenoviral que contenía un cassette de expresión dirigido por CMV rodeado por secuencias adenovirales (los nucleótidos 1-458 y los nucleótidos 3328-5788 adenovirales, respectivamente) para permitir la generación del genoma del vector mediante recombinación homóloga (Chartier y otros, 1996, *J. Virol.* 70, 4805-4810). En los vectores adenovirales resultantes, E3 (nucleótidos 28592-30470) y E1 (nucleótidos 459-3327) están eliminadas, y la región E1 está sustituida por el cassette de expresión que contiene, desde 5' a 3', el potenciador/promotor inmediato temprano de CMV, un intrón quimérico IgG/beta-globina humana, la secuencia que codifica la proteína de fusión y la señal de poliadenilación tardía de SV40. Los adenovirus recombinantes se generaron mediante la transfección de los genomas virales linealizados *PacI* en la línea celular de complementación PER C6 (Fallaux y otros, 1998, *Human Gene Therapy (Terapia Génica Humana)* 9, 1909-1917). La propagación, purificación y titulación del virus se realizaron tal como se ha descrito anteriormente (Erbs y otros, 2000, *Cancer Res* 60, 3813-3822).

Cultivo celular

30 En los ejemplos siguientes, se utilizan la línea celular de carcinoma pulmonar humano A549 (ATCC; CCL-185), el linfoblasto murino 2E8 (ATCC; TIB-239) y el hibridoma de células T 2B4.11 murino (Delgado y otros, 2001, *J. Immunol.* 166, 1028-1040). Las condiciones de cultivo son las habituales de la técnica. Con fines ilustrativos, las células se desarrollan a 37°C en DMEM (Gibco) complementado con Suero de Ternera Fetal al 10% y antibióticos. Las células se transfectan según las técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia.

35 Las líneas celulares de mastocitoma murino P815 (DBA/2; FcR+, H2D^d, MHCII+, ICAM1+, CD48+), y B16F10 (C57B1/6; H2D^b, MHCII-, MHCII-, ICAM1-, CD48-) son líneas celulares de cáncer de melanoma murino obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, TIB-64 y ATCC, CRL-6475, respectivamente). Las líneas celulares de carcinoma renal murino RenCa (BALB-C; H2D^d, MHCII+, MHCII+, Fas+) y de tumor murino TC1 se describen en Dybal y otros (1992, *J. Urol.* 148, 1331-1337) y Lin y otros (1996, *Cancer Res.* 56, 21-26), respectivamente. Todas las líneas celulares dieron negativo para micoplasma utilizando el colorante de Hoechst, cultivo celular y PCR.

Anticuerpos y citoquinas

45 La IL-2 antimurina e IFN-g antimurina marcadas con biotina se adquirieron de R&D Systems (Reino Unido). La IL-18 antimurina y la IL-7 antimurina marcadas con biotina se adquirieron de Prepotech Inc. (Estados Unidos). La IL-15 policlonal antiraton de conejo purificada se adquirió de eBioscience (Estados Unidos). La IL-21 antimurina de cabra purificada se adquirió de R&D Systems (Reino Unido). La IgG anticabra o la IgG anticonejo marcadas con biotina se adquirieron de Amersham Life Sciences (Estados Unidos).

Se utilizaron CD4 y CD8 antiraton de rata no conjugadas o antígenos de las células CD4, CD8, CD3, CD25, CD31, CD69, MAC1, CD11c, H-2K^b/D^b, Ia^b, NK-1.1, NK-T/NK antiraton de rata marcadas con PerCP-CY5.5, FITC o Ficoeritrina tal como definió por el fabricante

(Pharmingen; San Diego, CA; Estados Unidos). La CD3 antihumana de conejo no conjugada (que reacciona de forma cruzada con CD3 de ratón) o la IgG antirata de conejo y anticonejo de cabra marcada con peroxidada se utilizaron en las concentraciones sugeridas por DAKO (Alemania).

5 La medición de la apoptosis de células T (AICD) se realizó utilizando el kit de detección de apoptosis con Anexina V-FITC (Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos).

Las IFN-g, IL-2, IL-7, IL-21 murinas recombinantes se adquirieron de R&D Systems (Reino Unido). Las IL-15 e IL-18 murinas recombinantes se adquirieron de Peprotech Inc. (Estados Unidos).

La concanavalina A se utilizó a 1 µg/ml y se adquirió de SIGMA.

Análisis de la expresión de citoquinas multifuncionales

10 Se infectaron células RenCa o A549 en una suspensión con vectores adenovirales tal como se ha descrito anteriormente a una MOI (multiplicidad de infección) de 50 (30 minutos de incubación de las células con diluciones del virus en 100 µl de PBS complementado con FCS al 2%, cationes al 1%) (Erbs y otros, 2000, Cancer Res. 60, 3813-3822). A continuación, las células se cultivaron en medio completo que contenía FCS al 5% durante 48 horas. Se analizaron los ARN de las células A549 infectadas mediante transferencia Northern utilizando sondas específicas de ADN de citoquina de ratón marcadas con ³²P.

15 Se analizó la expresión de las citoquinas individuales que constituían cada una de las proteínas de fusión mediante transferencia Western según el protocolo de transferencia Western ECL™ proporcionado por Amersham Life Sciences (Reino Unido). Las células A549 se infectaron a una MOI de 50. Setenta y dos horas después de la infección, se recogieron los sobrenadantes y las células se lavaron una vez con PBS y se rompieron en tampón de muestra (Novex, Invitrogen, Francia) mediante sonicación. Se recogieron los sobrenadantes y los extractos celulares y, a continuación, se analizaron mediante transferencia Western en un gel Nupage al 4-12% (Novex, Invitrogen, Francia) utilizando citoquinas específicas antiratón y el sistema de detección ECL (Amersham Life Sciences).

Actividad biológica *in vitro* de citoquinas multifuncionales

25 Ensayo de proliferación de células T o B. Se evaluó la proliferación celular de células de bazo de ratón o de linfoblastos 2E8 mediante la captación de [³H]timidina tal como se ha descrito anteriormente (Gillis y otros, 1978, J. Immunol. 120, 2027-2032; Ishihara y otros, 1991, Dev. Immunol. 1, 149-161). Para la proliferación de células T, los esplenocitos se preactivaron mediante dosis bajas (20 ng/ml) de anticuerpo específico de CD3 murina (145-2C11, Pharmingen, San Diego, Estados Unidos) tal como se ha descrito anteriormente (Ting y otros, 1988, J. Immunol. 141, 741-748). Los esplenocitos activados por CD3 se mezclaron con las citoquinas de fusión a analizar que estaban contenidas en sobrenadantes de A549 infectados. Como control positivo, se estimularon células de bazo o 2E8 (5x10⁴ células/pocillo) en medio completo con ConA (10 µg/ml), 100 ng/ml de IL-2 murina recombinante o varias concentraciones de IL-7 murina (R&D Systems, Reino Unido). Después de 96 horas, a las células se les añadió a pulsos 1 µCi/pocillo de [³H]timidina. La incorporación de [³H]timidina en el ADN de las células T proliferantes se midió mediante la recogida del ADN celular sobre un papel de filtro de vidrio (recogedor PHD, Cambridge Technology, Estados Unidos) después de 4 horas y mediante el recuento de la radioactividad en un contador de centelleo líquido (Beckman, Alemania). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

30 Ensayo de secreción de IFN-g. Se determinó la bioactividad relativa de IL-18 murina por la capacidad de sobrenadantes de fusión a Ad (obtenidos de células infectadas) para aumentar la producción de IFN-g *in vitro* (Okamura y otros, 1995, Nature, 378, 88-91; Oshikawa y otros, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 13351-13356). De manera resumida, se cocultivaron esplenocitos de ratón con Con A (1,25 µg/ml) en placas de 24 pocillos durante 48 horas. Se añadieron sobrenadantes de fusión a Ad a suspensiones celulares de esplenocitos cebados con Con A en placas de 96 pocillos durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante ELISA para detectar la producción de IFN-g (Quantikine-R&D Systems, Minneapolis, Minn.).

35 Ensayos de citotoxicidad de células CTL y NK/NKT. También se analizaron las actividades de las citoquinas de fusión por la citotoxicidad de CTL y NK, tal como se ha descrito anteriormente (Paul y otros, 2000, Cancer Gene Ther. 7, 615-623). Se cocultivaron esplenocitos de ratón con sobrenadantes de fusión a Ad obtenidos de células A549 infectadas durante 7 días. Las actividades citotóxicas de esplenocitos cebados se midieron sobre P815-CTL diana o YAC-NK diana, tal como se ha descrito anteriormente (Shortman y otros, 1986, J. Immunol., 137, 798-804) utilizando el ensayo de citotoxicidad EuDTPA (Wallac Lab., Turku, Finlandia) (Blomberg y otros, 1993, J. Immunol. Methods, 160, 27-34).

40 Inmunoestimulación *in vitro*. A efectos de analizar el efecto *in vitro* de citoquinas multifuncionales de fusión, se incubaron células dendríticas derivadas de la médula ósea o esplenocitos con sobrenadantes de fusión a Ad durante 3 a 7 días. Se analizaron marcadores fenotípicos de la maduración y/o activación de células dendríticas, otras células APCs, B, T (CD4 y CD8), NK, y NKT utilizando anticuerpos específicos de ratón mediante análisis de citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson, Estados Unidos).

45 Ensayo ELISA

Se estimaron concentraciones de citoquinas de fusión mediante inmunoensayo ELISA. De manera resumida, se recubrió la solución de los sobrenadantes que contenían la fusión en una placa de 96 pocillos maxisorp (NUNC) durante toda la noche a 4°C. A continuación, se revelaron las citoquinas de fusión con IL-2 o IL-18 policlonales antiratón de conejo purificadas (Biovision CA). A continuación, se revelaron las IgG de conejo con una IgG monoclonal anticonejo específica conjugada con HRPO (Jackson Laboratories). Se utilizaron como control positivo los pocillos recubiertos con diluciones en serie de IL-2 murina o IL-18 murina recombinantes en medio de cultivo de tejido (R&D Systems, Minneapolis, Minn.) para generar curvas estándar para las estimaciones de concentraciones de fusoquina.

Ensayo AICD (Muerte Celular Inducida por Activación)

La AICD, en la que las señales normalmente asociadas con la estimulación de linfocitos dan lugar en cambio a la muerte de la célula, se ha propuesto como mecanismo de delección de linfocitos específicos de antígeno. Las células T pueden ser sensibles o resistentes a la AICD y la IL-2 puede regular la susceptibilidad de células T a la AICD (Brunner y otros, 1996, Int. Immunol., 8, 1017-1026; Nguyen y otros, 2001, Immunology, 103, 426-434). Los hibridomas de células T murinas son sistemas de modelos bien documentados para el estudio de la AICD. La mayoría de hibridomas de células T mueren en horas después de la activación por la presentación de anticuerpos anti-TCR o anti-CD3, seguido por el tratamiento con IL-2. La AICD se podría caracterizar por la síntesis *de novo* de Fas (CD95) y su ligando (FasL) (Brunner y otros, 1996, Int. Immunol., 8, 1017-1026). Para comparar la susceptibilidad del hibridoma de células T murinas a la AICD, se cultivaron células T 2B4.11 de hibridoma (Delgado y otros, 2001, J. Immunol. 166, 1028-1040) en placas de 96 pocillos recubiertas con anti-CD3 (anticuerpos 145-2C11; 4 µg/ml) durante 18 horas en medio completo. A continuación, se añadieron durante un periodo adicional de 18 horas los sobrenadantes de células A549 infectadas con Ad que codifica citoquinas multifuncionales o sobrenadantes de control (Ad que codifica mL-2, mL-7, mL-18, mL-21 individuales o adenovirus vacío). La IL-2 murina recombinante (R&D Systems, Reino Unido) también se utilizó como control positivo (10-20 ng/ml). La AICD se midió mediante un análisis de citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico FasL antiratón de ratón marcado con ficoeritrina (Kay-10, Pharmingen, San Diego, Estados Unidos) y un kit de detección de la apoptosis con Anexina V marcada con FITC (Pharmingen, San Diego, Estados Unidos).

La AICD también se midió *in vivo* después de la inyección subcutánea de adenovirus que codifican citoquinas multifuncionales de fusión. De manera resumida, se inyectaron una vez ratones C57BL/6 subcutáneamente con 2.10^8 iu de Ad-fusión (o como Ad control que codifica mL-2, mL-7, mL-18, mL-21 individuales o adenovirus vacío). Los nódulos linfáticos de drenaje se extrajeron a continuación a diferentes tiempos después de la inyección (5, 8 y 18 horas). La AICD se midió tal como se describe a continuación en linfocitos contenidos en el nódulo linfático.

Cuantificación de VLS (Ensayo del Síndrome de Pérdida Vascular)

Se estudió la pérdida vascular mediante la medición de la extravasación de azul de Evans que, cuando se administra intravenosamente, se une a proteínas del plasma, particularmente albúmina, y se puede detectar la siguiente extravasación en varios órganos tal como se ha descrito (Rafi-Janajreh y otros, 1999, J. Immunol. 163, 1619-1627). La pérdida vascular se indujo mediante inyección intravenosa de 2.10^9 iu de vector adenoviral que codifica IL-2 murina una vez por día durante tres días. Se inyectaron intravenosamente grupos de cinco ratones C57B1/6 con PBS, adenovirus vacío, Ad-mIL-2, Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 o Ad-fusiones. En el día 4, los ratones se inyectaron intravenosamente con 0,1 ml de azul de Evans al 1% en PBS. Después de 2 horas, los ratones se hicieron sangrar hasta morir bajo anestesia y el corazón se perfundió con heparina en PBS. Los pulmones y el hígado, donde se sabe que tiene lugar la máxima extravasación, se recogieron y colocaron en formamida a 37°C durante la noche. Se cuantificó el azul de Evans en los órganos mediante la medición de la absorbancia del sobrenadante a 650 nm. La VLS observada en ratones tratados con Ad-citoquina se expresó como el incremento en porcentaje de la extravasación en comparación con los controles tratados con PBS. Para estudios histopatológicos, grupos de cinco ratones separados se inyectaron con Ad vacío o PBS, Ad-mIL-2, Ad-mIL-2/mIL-7, Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) y Ad-mIL-2/IL-18 maduro (K89A) tal como se ha descrito anteriormente, y en el día 4, los pulmones e hígado se fijaron en una solución de formalina al 10%. Los órganos se embebieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se escaló la infiltración perivascular mediante el recuento del número de linfocitos que se infiltran en el vaso sanguíneo y el promedio del intervalo mínimo y máximo para cada grupo. Los sueros de los ratones inyectados también se recogieron para la medición de ASAT y ALAT.

Experimentos *in vivo*

Se tripsinizaron células tumorales murinas P815, B16F10, RenCa y TC1, se lavaron y se resuspendieron en PBS a 3×10^6 células/ml. A continuación, se inyectaron subcutáneamente cien microlitros de la suspensión celular en el costado derecho de ratones B6D2 inmunocompetentes de 6 a 7 semanas de vida. En los días 7, 8 y 9 después de la inyección, cuando los tumores eran palpables, los ratones recibieron tres inyecciones intratumorales de 5×10^8 iu de Ad-fusiones o controles de Ad diluidos en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM. El tamaño de los tumores y la tasa de supervivencia se evaluaron durante un periodo de tiempo de 120 días.

Para la evaluación del efecto inmunoadyuvante de Ad-fusiones en combinación con el vector MVA-E7, se inyectaron intravenosamente cien microlitros de la suspensión celular TC1 (3×10^6 células/ml) en la vena de la cola de ratones B6D2 inmunocompetentes de 6 a 7 semanas de vida. 39 días después de la inyección, los ratones recibieron

tres inyecciones intranasales de 5×10^8 iu de Ad-fusión (Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A)) diluido en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 1 mM en los días 39, 46 y 53 y tres inyecciones subcutáneas de 5×10^6 pfu de MVA-E7 en los días 42, 49 y 56. El tamaño de los tumores y la tasa de supervivencia se evaluaron durante un periodo de tiempo de 120 días.

5 Para la evaluación del efecto inmunoadyuvantes de las Ad-fusiones en combinación con el vector MVA-FCU-1, se inyectaron subcutáneamente cien microlitros de la suspensión celular B16F10 (3×10^6 células/ml) en el costado derecho de ratones B6D2 inmunocompetentes de 6 a 7 semanas de vida. En los días 7, 8 y 9 después de la inyección, cuando los tumores eran palpables, los ratones recibieron tres inyecciones intratumorales de 5×10^8 iu de Ad-fusión (Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A)) diluido en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 1 mM y 10^7 pfu de MVA-FCU1. El profármaco 5-FC se administró en el agua de alimentación a una concentración final del 0,5%. El tamaño de los tumores y la tasa de supervivencia se evaluaron durante un periodo de tiempo de 80 días.

10 La diferencia estadística en los experimentos de supervivencia *in vivo* entre los diferentes grupos se evaluó utilizando la aplicación exacta de Fischer (software Statistica 5.1, Statsoft Inc.) de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Una $P \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

Histología, inmuohistoquímica o análisis por citometría de flujo de una respuesta *in vivo*

15 Se establecieron tumores y se inyectaron con los diversos virus descritos anteriormente para los experimentos *in vivo*. En el día 13, se midieron y se extirparon los tumores. También se extrajeron a la vez los nódulos linfáticos del drenaje del tumor. Para el análisis por citometría de flujo, se rompieron los tumores mediante digestión con colagenasa (SIGMA), las células se tiñeron con los anticuerpos indicados y se analizó la población mediante citofluorimetría (Paul y otros, 2002, Cancer Immunol. Immunother. 51, 645-654).

20 Se extrajeron los tejidos de tumor P815 y se embebieron directamente en compuesto OCT sobre isopentano enfriado sobre hielo seco. Se utilizaron secciones de $5 \mu m$ para la tinción con Hematoxilina-Eosina (observaciones estructurales por microscopio de luz) o para inmuohistoquímica. La detección de las células y vasos sanguíneos de infiltración se realizó sobre criosecciones fijadas con metanol-acetona (50:50) utilizando los anticuerpos siguientes: CD4 antiratón de rata (n°553727-Pharmingen) en una dilución de 1/500, CD8 antiratón de rata (n°553027-Pharmingen) en una dilución de 1/500, CD3 antihumano de conejo (N1580-1/50 diluido en Dako) no diluido, CD11c antiratón de hámster (n°553799-Pharmingen) en una dilución de 1/100, la-le antiratón de rata (n°556999-Pharmingen) en una dilución de 1/500, CD25-FITC antiratón de rata (Pharmingen) en una dilución de 1/50, IL18-R antiratón de cabra (AF856-R&D Systems) en una dilución de 1/50, CD31 antiratón (n°01951D-Pharmingen) en una dilución de 1/50 y factor von Willebrand antihumano de conejo (A0082-Dako) en una dilución de 1/100. Se incubaron los primeros anticuerpos durante 1 hora y media a temperatura ambiente, se enjuagaron en TBS-Tween20 al 0,1%. Los anticuerpos primarios se revelaron mediante anticuerpos secundarios específicos Ig antirata de conejo (Z0494-Dako) en una dilución de 1/500, Ig antihámster de conejo (n°6074102-Rockland) en una dilución de 1/500, anticabra de caballo biotinilado al 0,5% (Vectastain Elite PK6200-Vector) o anti-FITC de conejo con HRP (P0404-Dako) acoplados en una dilución de 1/100, se incubaron durante 30 minutos y, a continuación, se enjuagaron en tampón. El polímero marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugado con el segundo anticuerpo de conejo (EnVision + System n°K4003-Dako) o Estreptavidina-HRP (Vector) se aplicó durante 30 minutos, a continuación, se enjuagó y se utilizó DiAminoBencidina (DAB) como sustrato. Todos los portaobjetos se contratiñeron con Hematoxilina.

EJEMPLO 1: Construcción de adenovirus que expresan citoquinas multifuncionales de fusión

40 La secuencia que codifica las citoquinas multifuncionales de fusión se construyó tal como se indica en la figura 1 y en Material y Métodos. Las fusiones generadas se indican a continuación: mIL-2/mIFN-g, mIFN-g/mIL-2, mIL-2/mIL-7, mIL-7/mIL-2, mIL-2/mIL-21, mIL-21/mIL-2, mIL-2/mIL-15, mIL-15/mIL-2, mIL-7/mIL-15, mIL-15/mIL-7, mIL-15/mIL-21, mIL-21/mIL-15, mIL-2/mproIL-18, mproIL-18/mIL-2, mIL-2/m IL-18 madura, m IL-18 madura/mIL-2, mIL-2/mproIL-18 (K89A), mproIL-18 (K89A)/mIL-2, mIL-2/IL-18 madura (K89A), IL-18 madura (K89A)/mIL-2. También se generaron las citoquinas de fusión que contenían los mutantes de IL-2 murina (D20I, N88R, N88G y Q126M).

45 La secuencia que codifica cada una de estas citoquinas multifuncionales se clonó en un plásmido lanzadera de adenovirus y se utilizó para generar los vectores de adenovirus con E1 y E3 eliminadas. También se clonaron las citoquinas de control individuales en un plásmido lanzadera de adenovirus (Ad-mIL-2, Ad- mIL-2 (D20I), Ad-mIL-2 (N88G), Ad-mIL-2 (N88R), Ad-mIL-2 (Q126M), Ad-mIFN-g, Ad-mIL-7, Ad-mIL-15, Ad-mIL-18, Ad-mIL-18 (K89A) y Ad-mIL-21).

50 La expresión de citoquinas multifuncionales de fusión en células A549 infectadas con los diferentes vectores de adenovirus se analizó mediante transferencia Northern y Western. El análisis de transferencia Northern reveló el tamaño correcto del ARNm específico de cada citoquina de fusión y de cada citoquina de control. El análisis de transferencia Western utilizando anticuerpos específicos de citoquina reveló una banda principal que tenía el peso molecular esperado para cada fusión individual. En algunos casos, se observaron bandas adicionales, reflejando casos de corte y empalme ("splicing") alternativo o patrón de glicosilación diferente. Se detectaron una expresión y niveles de secreción elevados para casi todas las fusiones (se detectan niveles más elevados en sobrenadantes de células infectadas con Ad-mIL-2/mproIL-18 y Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A)), a excepción de algunas de las fusiones que contenían IL-15 y Ad-mIL-15 (véase el Ejemplo 6).

Las cantidades de citoquinas de fusión recombinantes secretadas se midieron utilizando un ensayo ELISA específico de sobrenadantes de cultivo después de la infección de células A549 con vectores adenovirales que codifican las citoquinas de fusión IL-2/IL-18 y se compararon con las cantidad secretada por las células infectadas con Ad que codifican las citoquinas individuales.

5 Tabla 1

| | mIL-2(ng/ml) | mIL-18 (ng/ml) |
|------------------------------|------------------|------------------|
| Ad vacío | 0 | 0 |
| Ad-mIL-2 | $7 \cdot 10^4$ | 0 |
| Ad-m IL-18 madura | 0 | $6 \cdot 10^4$ |
| Ad-mproIL-18 | 0 | 250 |
| Ad-mproIL-18(K89A) | 0 | 200 |
| Ad-mIL-2/IL-18 madura | $3 \cdot 10^3$ | $2,5 \cdot 10^3$ |
| Ad-mIL-2/IL-18 madura (K89A) | $4 \cdot 10^3$ | $4 \cdot 10^3$ |
| Ad-mIL-2/mproIL-18 | $3 \cdot 10^4$ | $3 \cdot 10^4$ |
| Ad-mIL-2/mproIL-18(K89A) | $2,5 \cdot 10^4$ | $2,5 \cdot 10^4$ |

10 Tal como se observaba mediante en análisis de transferencia Western, mIL-2/mproIL-18 y mIL-2/mproIL-18 (K89A) se expresaban en células infectadas con Ad en los niveles más elevados en aproximadamente el mismo intervalo que mIL-2 sola, pero 100 veces más que Ad-proIL-18 sola. La expresión de mIL-2/IL-18 madura y mIL-2/IL-18 madura (K89A) era aproximadamente una décima parte de la observada con Ad-mIL-2, indicando que la falta de una prosequencia es perjudicial para la expresión, como mínimo, en el sistema de adenovirus.

15 También se evaluó la estabilidad de las citoquinas de fusión recombinantes *in vitro* mediante análisis de transferencia Western. Se infectaron las células A549 con Ad-mIL-2 o Ad-mproIL-18 (K89A) solas, o la combinación de Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A) o con un adenovirus que expresa la fusión IL-2/IL-18 (Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A)). Se analizaron los sobrenadantes después de 24 horas, 48 horas y 72 horas después de la infección. Se sondaron las transferencias ("blots") con (a) un anticuerpo IL-2 antiratón de conejo o (b) un anticuerpo IL-18 antiratón de conejo. De manera inesperada, se observó una mayor estabilidad de la expresión de IL-2 para la proteína de fusión mIL-2/mproIL-18 (K89A) en comparación con la citoquina sola o la combinación de las dos citoquinas. Además, también se observó una expresión más elevada de IL-18 cuando se expresa el grupo proIL-18 (K89A) como una fusión con mIL-2 (construcción Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A)), en lugar de cuando se expresa de manera individual (construcción Ad-mproIL-18 (K89A)). En base estos resultados, parece que la fusión de IL-2 con IL-18 permite mantener una proporción fija de tanto mIL-2 como mproIL-18 (K89A) a diferencia de la combinación de Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A).

25 La expresión de la citoquina de fusión mIL-2/mproIL-18 (K89A) también se evaluó mediante RT-PCR. Se inyectaron ratones B6D2 inmunocompetentes que tenían tumores P815 palpables con 5×10^8 iu de Ad vacío, Ad-mIL-2, Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A) o Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A). Los tumores se extrajeron 72 horas después de la inyección y se extrajeron los ARNm. Se llevó a cabo la RT-PCR utilizando sondas de oligonucleótidos específicas para mIL-2, mproIL-18 o secuencias específicas para la fusión mIL-2/mproIL-18 (K89A). Al igual que antes, la inyección de Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) dio como resultado el mantenimiento de una proporción fija de tanto mIL-2 como mproIL-18 (K89A), a diferencia de la combinación de Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A).

EJEMPLO 2: Funcionalidad *in vitro* de las citoquinas de fusión.

Funcionalidad *in vitro* de fusiones que contienen IL-2

35 El efecto de las proteínas de fusión sobre la estimulación de las células T se analizó mediante la evaluación de la proliferación de esplenocitos murinos cuando se incubaban con anti-CD3 más sobrenadantes de citoquinas de fusión con Ad, tal como se ha descrito en Materiales y Métodos. Se sabe que la IL-2 es un inductor fuerte de la proliferación de esplenocitos preactivados con CD3. De manera resumida, la proliferación de esplenocitos murinos incubados con sobrenadantes de Ad-fusión se midió en un ensayo de proliferación de células T. Se ajustaron las concentraciones se sobrenadante para que tuvieran un contenido equivalente ($20 \mu\text{g/ml}$) de citoquina total o citoquina de fusión. Tal como se muestra en la figura 2, se obtuvo un índice de estimulación elevada con los sobrenadantes de Ad-mIL-7/IL-2, y Ad-mIL-2/mproIL-18 (2, y 1,8, respectivamente), que era más elevado que el obtenido con Ad-mIL-2. La actividad de proliferación de células T de las Ad-fusiones que expresan la variante de IL-18 (K89A) también se analizó

5 mediante comparación con el Ad que expresa citoquinas individuales (Ad-mIL-2, Ad-mproIL-18 (K89A)) y la combinación de las dos (Ad-m-IL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A)). Los resultados confirman un índice de estimulación más elevada proporcionada por Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) que por Ad-mIL-2, Ad-mproIL-18 (K89A) o la combinación de las dos. Por otro lado, los sobrenadantes que contenían las fusiones IL-21/IL-2, IL-15/IL-7, IL-2/IL-15 e IL-15/IL-21 muestran índices de estimulación comparables con los obtenidos para los sobrenadantes de IL-2. No se observó proliferación con un sobrenadante de virus vacío.

Funcionalidad *in vitro* de fusiones que contienen IL-7

10 La funcionalidad *in vitro* de fusiones que contienen IL-7 se evaluó utilizando una línea celular dependiente de IL-7, la línea celular murina pro-B 2E8, que es capaz de crecer sólo en presencia de IL-7 en el medio. Se analizó la capacidad de los sobrenadantes de las células A549 infectadas Ad-mIL-2/IL-7 y Ad-mIL-7/IL-2 de inducir la proliferación de 2E8 y se comparó con los sobrenadantes de Ad-mIL-7 y la IL-7 recombinante como controles positivos y un Ad vacío como control negativo.

15 Tal como se esperaba, la IL-7 murina recombinante indujo la proliferación de 2E8 como sobrenadante de Ad-mIL-7. Tal como se muestra en la figura 3, la velocidad de proliferación de 2E8 tratada con los sobrenadantes de Ad-IL-2/IL-7 es más elevada que la obtenida con el sobrenadante de Ad-mIL-7 en las mismas diluciones. Como resultado, la velocidad de proliferación obtenida con los sobrenadantes de Ad-IL-2/IL-7, Ad-IL-7/IL-2 y Ad-IL-7 diluidos 1/10 es comparable con la obtenida con 20, 10 y 15 ng/ml de IL-7 murina recombinante, respectivamente. No se observó proliferación con un sobrenadante de virus vacío.

Funcionalidad *in vitro* de fusiones que contienen IL-18

20 La IL-18 se describe como un inductor potente de la secreción de IFN-g tanto *in vitro* como *in vivo*. Para evaluar la actividad biológica de las fusiones que contienen IL-18, se cuantificó la secreción de IFN-g murina por esplenocitos murinos cebados con conA tal como se ha descrito en Material y Métodos. Como resultado y tal como se muestra en la figura 4, los sobrenadantes que contenían Ad-mproIL-18/IL-2 diluidos 1/20 indujeron una concentración más elevada de IFN-g murina *in vitro* (7 a 8 $\mu\text{g/ml}/24\text{h}/10^6$ células) en comparación con las inducidas por Ad-mIL-2 (4 $\mu\text{g/ml}/24\text{h}/10^6$ células), Ad-mproIL-18 (2 $\mu\text{g/ml}/24\text{h}/10^6$ células) e IL-2/mproIL-18 (5,5 $\mu\text{g/ml}/24\text{h}/10^6$ células). Estas diferencias son estadísticamente significativas. La actividad biológica de citoquinas de fusión que contenían IL-18 (K89A) también se valoró mediante la evaluación de la secreción de IFN γ murina por esplenocitos cebados con conA. Tal como se muestra en la figura 5, los sobrenadantes que contienen fusiones IL-2/IL-18 (mIL-2/mproIL-18, mIL2/IL-18 madura, mIL-2/mproIL-18 (K89A) y mIL-2/IL-18 madura (K89A), respectivamente) inducen niveles ligeramente más elevados de IFN γ (aproximadamente 100 ng/ml/ 10^6 células) que los sobrenadantes que contienen mproIL-18 (K89A) sola o la combinación de AdmIL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A) (aproximadamente 80 y 60 ng/ml/ 10^6 células, respectivamente).

30 En una segunda serie de experimentos, la secreción de IFN γ también se cuantificó utilizando esplenocitos murinos no cebados. De manera inesperada, tal como se muestra en la figura 5, los esplenocitos no cebados fueron estimulados para secretar un nivel elevado de IFN γ sólo después de la activación con sobrenadantes de Ad que contenían las citoquinas de fusión mIL-2/mproIL-18, mIL-2/mproIL-18 (K89A), mIL-2/IL-18 madura y mIL-2/IL-18 madura (K89A). Esto sugiere una actividad nueva asociada con las citoquinas de fusión IL-2/IL-18 que no se observa con citoquinas individuales o una mezcla de las dos.

Funcionalidad *in vitro* de fusiones que contiene IFN-g

5 La funcionalidad del producto génico de IFN-g contenida en las fusiones de la presente invención se estimó utilizando la capacidad de esta citoquina de regular hacia arriba marcadores de activación en APC y células tumorales. En un experimento sencillo, se añadieron sobrenadantes de Ad-fusión a esplenocitos murinos *in vitro* durante 72 horas, a continuación se evaluó la regulación hacia arriba de marcadores de activación específicos para los esplenocitos murinos, APC y linfocitos CD8+ mediante un análisis por citometría de flujo para el cambio en linfocitos T (CD8+) y células dendríticas (CD11b), así como marcadores MHC de la clase I, marcadores MHC de la clase II utilizando anticuerpos específicos tal como se han descrito en Material y Métodos.

Tabla 2: Regulación hacia arriba de marcadores de activación en esplenocitos murinos

| Ad-Fusión | MHCI+ | MHCII+ | CD11b+ | CD8+ |
|----------------|-------|--------|--------|------|
| IFN-g rec | + | + | - | - |
| Ad vacío | ++ | ++ | + | + |
| Ad-mIL-2 | + | + | - | ++ |
| Ad-mIFN-g | +++ | ++ | + | + |
| Ad-mIL-2/IFN-g | ++++ | ++++ | +++ | +++ |
| Ad-mIFN-g/IL-2 | +++ | +++ | ++ | +++ |

= sin células positivas

+ = entre el 1 y el 5% de células positivas

++ = entre el 10 y el 20% de células positivas

+++ = entre el 20 y el 40% de células positivas

++++ = más del 40% de células positivas

10

15 Tal como se muestra en la Tabla 2, los sobrenadantes de células infectadas con la fusión AdIL-2/IFN-g son más potentes para inducir la regulación hacia arriba de moléculas MHC de clase I y moléculas MHC de clase II *in vitro*, pero también de manera inesperada para incrementar rápidamente el número de APC (CD11b⁺) y linfocitos T CD8+. Los sobrenadantes de Ad-IFN-g/IL-2 inducen el mismo nivel de respuesta que Ad-IFN-g con respecto a estos marcadores. IL-2 induce un nivel bajo de activación de estas poblaciones de células.

Capacidad *in vitro* de las proteínas de fusión para incrementar la citotoxicidad de células efectoras

Se analizaron las actividades de citoquinas multifuncionales por la citotoxicidad de CTL y NK tal como se ha descrito en Material y Métodos. Se incubaron los sobrenadantes de células A549 infectadas con Ad-fusión durante 7 días con esplenocitos murinos. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

5 Tabla 3: Incremento de la citotoxicidad de células efectoras

| Ad-Fusión | Actividad CTL | Actividad NK |
|-------------------|---------------|--------------|
| Ad vacío | - | - |
| Ad-mIL-2 | ++ | +++ |
| Ad-mIFN-g | - | + |
| Ad-mIL-7 | - | - |
| Ad-mproIL-18 | ++ | ++ |
| Ad-mIL-21 | - | ++ |
| Ad-mIL-2/IFN-g | + | ++ |
| Ad-mIFN-g/IL-2 | + | +++ |
| Ad-mIL-2/IL-7 | + | + |
| Ad-mIL-7/IL-2 | +++ | ++++ |
| Ad-mIL-2/proIL-18 | +++ | +++ |
| Ad-mproIL-18/IL-2 | + | ++ |
| Ad-mIL-2/IL-21 | ++ | + |
| Ad-mIL-21/IL-2 | - | ++ |

= sin lisis específica

+ = entre el 20 y el 40% de lisis para una proporción E/T de 50/1

++ = entre el 40 y el 60% de lisis para una proporción E/T de 50/1

+++ = entre el 60 y el 80% de lisis para una proporción E/T de 50/1

++++ = entre el 80 y el 100% de lisis para una proporción E/T de 50/1

10 Tal como se muestra en la Tabla 3, los sobrenadantes de células A549 infectadas con Ad-mIL-7/IL-2 y Ad-mproIL-18/IL-2 indujeron una actividad citotóxica elevada en la actividad *in vitro* tanto de CTL como de NK. Estas actividades son bastante superiores a las obtenidas con los sobrenadantes de Ad-mIL-2, Ad-mIL-7 y Ad- mproIL-18. Además, los sobrenadantes de Ad-mIFN-g/IL-2 indujeron una respuesta elevada sobre la citotoxicidad de NK, pero no sobre la respuesta de CTL.

15 Además, se evaluó el efecto de la fusión mIL-2/mproIL-18 (K89A) para las actividades de citotoxicidad de CTL y NK y se comparó con el de cada citoquina sola (mIL-2 o mproIL-18 (K89A), respectivamente), o la combinación de mIL-2+mproIL-18 (K89A). Los esplenocitos murinos se cultivaron durante 7 días con sobrenadantes de células A549 infectadas con el correspondiente Ad (Ad-mIL-2, Ad-mproIL-18 (K89A), Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A) y Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A)). Las concentraciones de sobrenadante se ajustaron para que tuvieran un contenido equivalente (20 µg/ml) de citoquina total o fusoquina. Los resultados muestran que los sobrenadantes de células A549 infectadas con la fusión Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) indujeron una actividad citotóxica en las células diana P815 y YAC. De manera inesperada, la actividad lítica por los esplenocitos cultivados con la fusión mIL2/proIL18 (K89A) fue superior a la observada por esplenocitos cultivados con sobrenadantes que contenían citoquinas individuales o la mezcla mIL-2+mproIL-18 (K89A).

20

Inducción de células CD8, NK y NKT

Se evaluó la capacidad de las citoquinas de fusión de inducir la proliferación de células efectoras inmunes innatas y adaptativas. Para este fin, se cuantificó el porcentaje de linfocitos T CD8, células efectoras NK y

NK/NKT mediante citometría de flujo utilizando esplenocitos murinos cultivados durante una semana con sobrenadantes de Ad-fusión. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Inducción de la proliferación de CD8, NK y NKT

| Ad-fusión | CD8(%) | NK(%) | NK-T/NK(%) |
|--------------------|--------|-------|------------|
| mIL-21 rec | 27 | 5 | 25 |
| Ad vacío | 14 | 3 | 7 |
| Ad-mIL-2 | 58 | 5 | 11 |
| Ad-mproIL-18 | 41 | 16 | 45 |
| Ad-mIL-21 | 49 | 13 | 38 |
| Ad-mIL-2/mproIL-18 | 51 | 15 | 60 |
| Ad-mproIL-18/IL-2 | 55 | 14 | 7 |
| Ad-mIL-2/IL-21 | 43 | 15 | 53 |
| Ad-mIL-21/IL-2 | 45 | 11 | 54 |

mIL-21 rec = IL-21 murina recombinante (20 ng/ml)

5 Tal como se muestra en la Tabla 4, todos los sobrenadantes de Ad-fusión analizados inducen la misma proporción (aproximadamente el 50%) de linfocitos T CD8⁺ (células efectoras específicas) que el sobrenadante de Ad-mIL-2. Además y a diferencia de Ad-mIL-2 o Ad-mIL-21, los sobrenadantes de Ad-fusión (Ad-mIL-2/mproIL-18, Ad-mIL-2/IL-21 y Ad-mIL-21/IL-2) inducen una proporción muy impresionante (>50%) de células NK/NKT⁺. Las células NKI.1⁺ también se indujeron de manera significativa en presencia de sobrenadantes de Ad que codificaban estas proteínas de fusión.

10 Además, se ha observado que la incubación de esplenocitos murinos con mIL-2/proIL-18 (K89A) induce un incremento rápido en el porcentaje de las células CD8⁺ (50%), NK⁺ (18%) y NK/NKT⁺ (51%) en comparación con los esplenocitos cultivados con Ad vacío, sobrenadantes generados con Ad-mIL-2 y Ad-mproIL-18 (K89A).

Efecto de las citoquinas de fusión en la maduración de células dendríticas murinas

15 Las células dendríticas derivadas de la médula ósea se obtuvieron de ratones C57B16 tal como se ha descrito anteriormente (Fields y otros, 1998, J. Immunother. 21, 323-339). Las células dendríticas inmaduras se incubaron con sobrenadantes de Ad-fusión durante 48 horas antes del análisis del fenotipo mediante un análisis por citometría de flujo. La regulación hacia arriba del factor de maduración de las células dendríticas murinas se determinó mediante la medición del porcentaje de los marcadores CD80, CD86 y MHC II-lab utilizando un anticuerpo monoclonal específico (Pharmingen). Se observó que los sobrenadantes obtenidos de las células infectadas con Ad-mIL-7/IL-2 y Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) regulaban hacia arriba los marcadores CD80, CD86 y MHCII, reflejando la maduración de DC murinas, aunque a un nivel ligeramente inferior que un control positivo (LPS, 1 µg/ml, DIFCO) o sobrenadante de Ad-mIL-7.

20 En conclusión, los vectores de adenovirus que expresan citoquinas multifuncionales son totalmente funcionales, muestran en algunos casos una actividad biológicamente superior que simplemente la actividad aditiva de las citoquinas individuales que forman la fusión. También se detectaron actividades inesperadas para algunas de estas funciones, tales como la capacidad de la fusión IL2/IL-18 (especialmente mIL-2/mproIL-18 (K89A)) de activar células NKT murinas y la capacidad de las fusiones IL-7/IL-2 e IL2/IL-18 (especialmente mIL-2/mproIL18 y mIL-2/mproIL-18 (K89A)) de inducir la maduración de DC murina.

30 EJEMPLO 3: Toxicidad de las citoquinas de fusión

Además de su papel en la activación inicial de las células T y NK, IL-2 tiene un papel crítico en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Lenardo, 1996, J. Exp. Med. 183, 721-724). En este aspecto, IL-2 tiene una importancia central en la muerte celular inducida por activación (AICD) mediada por Fas, un proceso que conduce a la eliminación de las células T autorreactivas (Lenardo, 1996, J. Exp. Med. 183, 721-724; Van Parijs y otros, 1999, Immunity (Inmunidad) 11, 281-288). Como resultado de este papel fundamental en la AICD, las células T generadas en respuesta a vacunas de tumores que contienen IL-2 pueden interpretar las células tumorales como propias y las células T reactivas al tumor pueden morir por la apoptosis inducida por AICD.

Recientemente, se ha descrito que la AICD limita la función efectora de células T específicas de tumor

5 CD4 y disminuye la actividad efectora de células T (Saff y otros, 2004, J. Immunol. 172, 6598-6606). También se conoce que la IL-2 es necesaria de forma crítica para la activación de la función supresora de células T CD4+CD25+ (Thorton y otros, 2004, J. Immunol. 172, 6519-6523; Shimizu y otros, 1999, J. Immunol. 163, 5211-5218). Aunque la terapia con IL-2 ha producido resultados esperanzadores en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, su utilización está limitada por la toxicidad dependiente de la dosis caracterizada por la ganancia de peso, disnea, ascitis, y edema pulmonar. Estos signos de toxicidad resultan del aumento de la pérdida capilar, también conocido como síndrome de la pérdida vascular (VLS) (Rosenstein y otros, 1986, J. Immunol. 137, 1735-1742; Baluna y Vitetta, 1997, Immunopharmacology (Inmunofarmacología) 37, 117-132; Baluna y otros, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 3957-3962). Por esta razón, la toxicidad de las citoquinas de fusión de la presente invención se comparó con la proporcionada por los análisis de IL-2 en AICD y VLS.

Análisis de AICD

10 El porcentaje de los dos marcadores apoptóticos (anexina y ligando Fas (FasL)) se evaluó en análisis de AICD tanto *in vitro* como *in vivo*, tal como se ha descrito en Material y Métodos. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

15 Tabla 5: Toxicidad *in vitro* de citoquinas de fusión. Medición de la AICD (los resultados se presentan como el porcentaje sobre el total de células que pasaron)

| Ad-fusión | Anexina V+ | FasL+ |
|-----------------------|------------|-------|
| Medio | 40 | 7 |
| mIL-21 rec (10 ng/ml) | 65 | 24 |
| Ad vacío | 42 | 8 |
| Ad-mIL-2 | 67 | 25 |
| Ad-mIL-7 | 50 | 22 |
| AdmIL-18 | 55 | 23 |
| Ad-mIL-2/IL-18 | 48 | 18 |
| Ad-mIL-7/IL-2 | 36 | 9 |

20 *In vitro*, los sobrenadantes Ad-mIL-7/IL-2 y Ad-mIL-2/IL-18 protegen las células 2B4.11 de la AICD tal como se refleja por el nivel bajo de los dos marcadores apoptóticos Anexina V y FasL (36 y 48% de células de Anexina V+ y 9 y 18% de células FasL+, respectivamente). En un contraste destacado, el tratamiento con IL-2 murina recombinante y Ad-mIL-2 indujo una apoptosis elevada (65 y 67% de células de Anexina V+ y 24 y 25% de células FasL+, respectivamente).

25 La AICD se evaluó *in vivo* en los nódulos linfáticos de drenaje, 8 horas después de la inyección subcutánea de Ad-fusiones o Ad-IL-2. La Tabla 6 resume los resultados obtenidos. Los resultados son representativos de dos experimentos, cada uno con tres ratones.

Tabla 6: Toxicidad *in vivo* de citoquinas de fusión. Medición de la AICD (los resultados se presentan como porcentaje sobre el total de células que pasaron)

| Ad-fusión | Anexina V+ | FasL+ |
|--------------------------|------------|-------|
| Ad vacío | 2 | nt |
| Ad-mIL-2 | 48 | 29 |
| Ad-mIL-2/mproIL-18 | 19 | 18 |
| Ad-mIL-2/mproIL-18(K89A) | 9 | 15 |
| Ad-mIL7/IL-2 | 6 | 12 |

30 Tal como se ilustra en la Tabla 6, el análisis por citometría de flujo de las células contenidas en los nódulos linfáticos reveló que la inyección de Ad-mIL-2 induce una fuerte AICD *in vivo* (48% para células de Anexina V+ y 29% para células de FasL+). En destacado contraste, IL-2/mproIL-18 (19% para células de Anexina V+ y 18% para

células de FasL+), mL-2/mproIL-18 (K89A) (9% para células de Anexina V+ y 15% para células de FasL+) e incluso mejor IL-7/IL-2 (6% para células de Anexina V+ y 12% para células de FasL+) protegen las células T de la AICD inducida por IL-2.

5 En conclusión, los ensayos de AICD tanto *in vitro* como *in vivo* demuestran el estado de baja apoptosis conferido por las proteínas de fusión de la presente invención.

Ensayos de VLS

10 Para evaluar la toxicidad de las citoquinas de fusión candidatas, se administraron intravenosamente a grupos de ratones C57B1/6 sanos dosis elevadas de Ad vacío o vectores adenovirales que codificaban mL-2, mproIL-18 (K89A), la combinación de mL-2 + mproIL-18 (K89A) y las citoquinas de fusión mL-2/mIL7, mL-2/mproIL-18 (K89A) y mL-2/IL-18 madura (K89A). Tal como se muestra en la figura 6, las dos versiones de la fusión mL-2/mproIL-18 (K89A) y mL-2/IL-18 madura (K89A) inducen mucha menos pérdida vascular que mL-2 y la combinación de mL-2+mproIL-18 (K89A). También se observó una pérdida vascular reducida en ratones inyectados con Ad-mIL-2/mIL-7. Estos datos demuestran que las fusiones genéticas de IL-2 y proIL-18 (K89A), así como IL-2 e IL-7 reducen rápidamente la toxicidad de las citoquinas asociada con la vasopermeabilidad.

15 Además, la toxicidad reducida proporcionada por la citoquina de fusión fue confirmada mediante la cuantificación de las enzimas hepáticas ASAT y ALAT en suero de ratones inyectados. Los resultados demuestran que la ausencia de toxicidad hepática después del tratamiento con Ad-mIL-2 o Ad-citoquinas de fusión.

EJEMPLO 4: Funcionalidad *in vivo* de citoquinas de fusión

20 La actividad antitumoral de las citoquinas de fusión de la presente invención se investigó en cuatro modelos de tumores (P815, RenCa, B16F10 y TC1). Los tumores se establecieron en ratones B6D2 y se evaluaron el crecimiento del tumor y la supervivencia del ratón después de tres inyecciones intratumorales de Ad-fusiones (5×10^8 iu) durante un periodo de tiempo de 120 días. La tabla 7 resume los resultados obtenidos en los cuatro modelos de tumores.

25 Tabla 7: Actividad antitumoral en modelos de tumores murinos (los resultados se expresan en porcentaje de ratones sin tumor durante un periodo de 120 días)

| Ad-Fusión | P815 | B16F10 | RenCa | TC1 |
|--------------------------|------|--------|-------|-----|
| Ad-mIL-2 | 0 | 60 | 80 | 30 |
| Ad-mIL-7 | 0 | 0 | 10 | 0 |
| Ad-mproIL-18 | 0 | 0 | 20 | 10 |
| Ad-mproIL-18(K89A) | 0 | 0 | 10 | 10 |
| Ad-mIL-21 | 10 | 0 | 30 | nt |
| Ad-mIFN-g | 5 | 0 | 15 | nt |
| Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 | 10 | 40 | 80 | nt |
| Ad-mIL-2/mproIL-18 | 40 | 30 | 70 | 40 |
| Ad-mIL-2/mproIL-18(K89A) | 70 | 50 | 90 | 60 |
| Ad-mIL-7/IL-2 | 20 | 20 | 70 | 30 |
| Ad-mIL-21/IL-2 | nt | 10 | 50 | nt |
| Ad-mIFN-g/IL-2 | nt | 10 | 60 | nt |

nt = no evaluado

30 Tal como se muestra en la tabla 7, Ad-mIL-2/mproIL-18 es la fusión más eficaz para curar tumores de varios orígenes (de manera especial, mastocitomas murinos (P815), carcinomas renales (RenCa) y tumores transformados por HPV (TC1). De manera más destacada, la protección antitumoral observada para esta citoquina de fusión es significativamente más elevada que la conferida por la administración de un vector que codifica las citoquinas individuales (véase Ad-mIL-2 o Ad-mproIL-18), así como la administración conjunta de vectores que codifican por separado estas citoquinas (Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18), como mínimo, en los modelos de tumores RenCa, P815 y TC1. Además, la utilización de una forma mutada de IL-18 (K89A) aumenta rápidamente la eficacia antitumoral de todos los

modelos de tumores (véase Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) que proporciona el 70% de ratones sin tumores en el modelo P815, el 50% en el modelo B16F10, el 90% en el modelo RenCa y el 60% en el modelo TC1). También se observó actividad antitumoral significativa en varios modelos de animales tratados con Ad-mIL-7/IL-2. Ad-mIL-21/IL-2 y Ad-mIFN-g/IL-2 también proporcionan una protección antitumoral en el mismo grado que Ad-mIL-2.

5 La reducción *in vivo* de las células CD8, NK y CD4 se realizó tal como han descrito Slos y otros, 2001, Cancer Gene Ther. 8, 321-332). Los datos de supervivencia muestran que la actividad antitumoral de Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) era estrictamente dependiente de la actividad de las células CD8 y NK. De manera destacada, la reducción de CD4 aumentó la actividad *in vivo* de la administración intratumoral de la citoquina de fusión.

10 De manera destacada, cabe indicar que no se observó respuesta inmune contra la citoquina de fusión *in vivo* en el suero de los ratones tratados (datos no mostrados).

La eficacia antitumoral *in vivo* de las citoquinas de fusión también se correlacionó con el análisis de infiltrados intratumorales y de la activación proximal de células efectoras inmunes innatas y adaptativas (en los nódulos linfáticos de drenaje) mediante histología, inmunohistoquímica o citometría de flujo en el modelo P815 tal como se ha descrito en Material y Métodos. Los resultados se presentan en la tabla 8.

15

Tabla 8: Análisis de infiltrados tumorales después de la inyección intratumoral de fusiones AD.

| | NI | Ad- vacío | Ad-mIL-2 | Ad-mIL-7/IL-2 | Ad-mIL-2/IL-18 | Ad-mIL-2/IL-18* |
|----------|-----|-----------|----------|---------------|----------------|-----------------|
| CD3 | + | + | ++ | ++ | ++++ | ++++ |
| CD4 | + | + | +++ | +++ | + | ++ |
| CD8 | - | - | - | + | +++ | +++ |
| CD25 | + | + | + | ++ | +++ | ++ |
| Ia-Ie | - | + | + | + | ++ | +++ |
| IL-18R | + | + | + | + | ++++ | +++ |
| CD-31 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ |
| vonW | + | + | + | ++ | +++ | ++++ |
| necrosis | <5% | <10% | <10% | <5% | 30-40% | 70-80% |

- = sin células positivas

+ = entre el 1 y el 5% de células positivas

++ = entre el 10 y 20% de células positivas

+++ = entre el 20 y el 40% de células positivas

++++ = más del 40% de células positivas

Tal como se muestra en la Tabla 8, después de las inyecciones de Ad-fusión, el análisis por inmunohistoquímica revela que los tumores inyectados con Ad-mIL-2/mproIL-18 y Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) son altamente necróticos. Además, la inmunohistología muestra cambios pronunciados en los patrones de infiltración que difieren de la histología inicial del tumor, con un incremento en la cantidad de células T activadas por CD8⁺/CD25⁺, células T CD4⁺ y APC. Además, los tumores inyectados muestran claramente una regulación hacia arriba del receptor de IL-18. Dichos cambios también se observan en tumores P815 inyectados con Ad-mIL-2/mproIL-18 o Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A). De manera sorprendente, los tumores inyectados con Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) son altamente positivos para el factor de von Willebrand factor, lo que sugiere la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Se observaron resultados similares en los nódulos linfáticos del drenaje del tumor P815. Además, las inyecciones intratumorales de Ad-mIL-2/mproIL-18 y Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) no inducen ninguna AICD en los nódulos linfáticos del drenaje del tumor. Esto contrasta con los tumores P815 tratados con Ad-mIL-2. Además, en ratones tratados con Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) y Ad-mIL-7/IL-2, se observó un incremento de las células inmunes (x30 a x40) en los nódulos linfáticos, mientras que se detectó un menor número de células inmunes en los nódulos linfáticos de ratones tratados con Ad-mIL-2. Este aumento se correlaciona con un rápido descenso del número de células tumorales. Esto demuestra claramente la correlación inversa entre el número total de células en el tumor y el número total de células en el nódulo linfático de drenaje. Las células efectoras inmunes presentes en los nódulos linfáticos después de la inyección intratumoral de Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) y Ad-mIL-7/IL-2 son principalmente linfocitos T CD8⁺ activados (CD3⁺/CD69⁺; CD8⁺/CD25⁺) y también APC activadas, tales como células dendríticas maduras (CD11c⁺/MHCII⁺). La proporción y el número de estas células efectoras es superior después de la inyección con Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) y Ad-mIL-7/IL-2 que con Ad-mIL-2, Ad-mproIL-18 (K89A), Ad-mIL-7 solas o la combinación de Ad-mIL-2 + Ad-mproIL-18 (K89A).

EJEMPLO 5: Evaluación del efecto inmunoadyuvante de Ad-fusiones para inmunoterapia específica

El efecto inmunoadyuvante de la Ad-fusión se evaluó en el modelo metastático TC1. Las células TC1 se inyectaron mediante ruta intravenosa a efectos de establecer metástasis en el pulmón de ratones C57Bl6. Se administraron varias Ad-fusión 10 días después mediante las rutas intranasal o intratraqueal para permitir la expresión de la proteína de fusión en el medio de la metástasis en los pulmones e inducir también una inmunidad en la mucosa. La administración de Ad-mIL-2/IL-18 mediante las rutas intranasal o intratraqueal indujo una IgA total en los lavados vaginales de los ratones tratados 15 días después de la administración del adenovirus. El nivel de IgA total era similar después de la administración intranasal o intratraqueal. Además, la tasa de anticuerpo neutralizante antiadenovirus es significativamente inferior después de la administración de Ad-mIL-2/IL-18 que después de la administración de adenovirus vacío o Ad-mIL-2. Estos resultados podrían ser de importancia, ya que indican que la potencial readministración de los vectores adenovirales que codifican las proteínas de fusión podría facilitarse debido a la menor respuesta inmune humoral contra estos vectores.

Además, los análisis por RT-PCR mostraron que estas dos rutas "por mucosa" permiten una expresión muy buena de la citoquina de fusión IL-2/IL-18 en el pulmón y más exactamente en la metástasis de TC1 presente en el pulmón. De manera destacada, la expresión de la fusión se correlacionaba con un fuerte efecto *in vivo*, ya que el crecimiento de la metástasis de TC1 se detenía en los ratones tratados.

De manera conjunta, estos resultados indican una potencial utilidad de las citoquinas de fusión como adyuvantes para vacunas contra el cáncer o virales.

También se valoró la utilización de la citoquina de fusión mIL-2/proIL-18 (K89A) como adyuvante genético para una vacuna específica contra el cáncer. En primer lugar, se realizó la evaluación del efecto inmunoadyuvante de Ad-fusiones en el modelo metastático de TC1 en combinación con un vector MVA que expresa un antígeno E7 no oncogénico y anclado a membrana de la cepa HPV-16 dirigido por el promotor 7.5 K (véase el documento W099/03885). Los ratones recibieron tres inyecciones intranasales de 5×10^8 iu de Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) en los días 39, 46 y 53 y tres inyecciones subcutáneas de MVA-E7 en los días 42, 49 y 56. Se evaluaron el tamaño de los tumores y la tasa de supervivencia durante un periodo de tiempo de 120 días. Tal como se muestra en la figura 7, la combinación de un vector que expresa un antígeno específico de tumor como MVA-E7 con un adenovirus que expresa una fusión IL-2/IL-18 aumentaba fuertemente la respuesta inmune específica de tumor en el modelo TC1 metastático en fase muy tardía. Esta combinación podría incrementar la supervivencia de animales tratados y disminuir el número de metástasis residual.

También se evaluó el efecto inmunoadyuvante de Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) en el modelo B16F10 en combinación con un vector MVA que expresa el gen suicida FCU-1 situado bajo el control del promotor quimérico Ilk7.5K (documento W099/54481). Se inyectaron subcutáneamente cien microlitros de la suspensión celular B16F10 (3×10^6 células/ml) en el costado derecho de ratones B6D2 inmunocompetentes de 6 a 7 semanas de vida. En los días 7, 8, y 9 después de la inyección, cuando los tumores eran palpables, los ratones recibieron tres inyecciones intratumorales de 5×10^8 iu de Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) diluido en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM y 10^7 pfu de MVA-FCU1. El profármaco 5-FC se administró en el agua de alimentación a una concentración final del 0,5%. Se evaluaron el tamaño del tumor y la tasa de supervivencia durante un periodo de tiempo de 80 días. Tal como se muestra en la figura 8, la combinación de Ad-mIL-2/proIL-18 (K89A) con MVA-FCU1 mejoró claramente la eficacia antitumoral de una estrategia de terapia con genes suicidas. Esto es una indicación del potente efecto adyuvante de la citoquina de

fusión mL-2/proIL-18 (K89A) con una estrategia basada en quimioterapia.

Estos resultados demuestran claramente el potencial de la Ad-fusión mL-2/proIL-18 (K89A) de la presente invención como adyuvante genético para la vacunación en combinación con inmunógeno (por ejemplo, antígenos específicos de tumores, tales como E7 de HPV-16) y para la vacunación específica del cáncer en combinación con una terapia de genes suicidas y quimioterapia apropiada.

EJEMPLO 6: Citoquinas de fusión que contienen IL-15.

Las construcciones de Ad que contienen IL-15 se describen en el ejemplo 1 (mIL-2/mIL-15, mL-15/mIL-2, mL-7/mIL-15, mL-15/mIL-7, mL-15/mIL-21, mL-21/mIL-15). Además, también se realizó la fusión de mL-15 a mproIL-18 (K89A) utilizando el mismo esquema de construcción descrito en Material y Métodos y en el ejemplo 1. Debe indicarse que en las construcciones donde IL-15 se localiza en el extremo NH₂ terminal de la fusión (mIL-15/mIL-2, mL-15/mIL-7, mL-15/mproIL-18 (K89A) y mL-15/mIL-21), el grupo IL-15 se diseña para que comprenda el péptido señal de IL-2 que se fusiona en el marco de lectura con la IL-15 murina madura (tal como se representa en la SEC ID NO: 5). La Ad-mIL-15 control también comprende la IL-15 madura precedida por el péptido señal de IL-2.

La expresión de las fusiones que contienen IL-15 se determinó mediante transferencia Western en células A549 infectadas con los diferentes vectores Ad tal como se ha descrito en Material y Métodos. Se detectaron una expresión y niveles de secreción bajos para la mayoría de fusiones que contenían IL-15, así como Ad-mIL-15, a excepción de las fusiones mL-15/mIL-7, mL-21/mIL-15 y mL-15/mproIL-18 (K89A) que se secretaron a niveles elevados en el medio de cultivo de células A549 infectadas.

Se investigó la actividad antitumoral de los adenovirus que codifican citoquinas de fusión basadas en IL-15 en ratones que tenían tumores B16F10 que se trataron mediante tres inyecciones intratumorales. Se evaluó el crecimiento del tumor durante 43 días después de la implantación. Tal como se muestra en la figura 9, la inyección intratumoral de Ad-mIL-15/mIL-7, Ad-mIL-21/mIL-15 y Ad-mIL-15/mproIL-18 (K89A) permite un control estadístico del crecimiento del tumor en los animales tratados en comparación con la inyección intratumoral de un Ad sin transgén (Ad vacío) o el Ad-mIL-15 control que expresa mL-15 solo.

A efectos de mejorar la secreción de IL-15 en la fusión, se diseñaron construcciones adicionales para evaluar otros péptidos señales. En la construcción Ad-mIL-15, el péptido señal de IL-2 se sustituyó por el péptido señal de IL-15 en su versión larga sin (sPLSP) o la forma natural corta (empalme "splice" sPLSP) (Kurys y otros, 2000, J. Biol. Chem. 275, 30653) o por un péptido señal heterólogo obtenido de la cadena ligera kappa de una inmunoglobulina G de ratón (spVKL) (Meazza y otros, 2000, Int. J. Cancer 87, 574). La expresión y la secreción de IL-15 dirigida por los péptidos señales respectivos se evaluó mediante transferencia Western y se compararon con la construcción original equipada con el péptido señal de IL-2. Los resultados muestran que la utilización del péptido señal endógeno de IL-15 (versión corta) y, de manera especial, el péptido señal de IgG podría mejorar de manera destacada el nivel de secreción de IL-15 en un factor de 3 a 10. Además, se investigó la actividad antitumoral del adenovirus que codifica la citoquina IL-15 controlada por los diversos péptidos señales en ratones que tenían tumores B16F10. Tal como se muestra en la figura 10, la inyección intratumoral de la construcción Ad-IL-15 altamente secretable utilizando el péptido señal de IgG vKL proporciona una tasa de supervivencia mucho más elevada que las otras formas de IL-15. Se está realizando la construcción de citoquinas de fusión que incorporan el péptido señal versión vKL-IL-15 a efectos de mejorar la actividad y el efecto inmunoadyuvante de las fusiones IL-15/IL-7, IL-21/IL-15, e IL-15/proIL-18 (K89A).

Discusión general

La disponibilidad de citoquinas recombinantes ha permitido investigar en la biología de las citoquinas, así como su aplicación en un ambiente clínico. Un aspecto que resulta claro es que la inyección sistémica de grandes dosis de citoquinas está asociada con una toxicidad considerable, normalmente debido al síndrome de pérdida vascular o acompañado por el mismo. Además de su toxicidad sistémica, el valor terapéutico de IL-2 también está limitado por su vida media corta. Una estrategia descrita en la literatura para superar los problemas de toxicidad y vida corta es fusionar IL-2 a un anticuerpo (inmunocitoquina IL-2) o una proteína con una vida media larga, para dirigir la fusión a un único antígeno/receptor en el cuerpo. En una estrategia diferente, la presente invención da a conocer un conjunto de proteínas de fusión de citoquinas en un intento por combinar citoquinas que estimulan el sistema inmune innato con citoquinas que inducen una respuesta inmune adaptativa. Se fusionaron genéticamente un conjunto de citoquinas, incluyendo IFN γ , IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21 a IL-2 y se produjeron utilizando un sistema de expresión de adenovirus con E1 y E3 eliminadas a efectos de explorar sus propiedades biológicas *in vitro* e *in vivo* y la actividad antitumoral después de la inyección intratumoral. De éstas, varias citoquinas de fusión han mostrado propiedades interesantes, que incluyen el mantenimiento de la actividad biológica de las dos citoquinas implicadas en la fusión y, de manera destacada, una toxicidad reducida (por ejemplo, mL2/proIL18 y mL7/IL2). Además, la presente invención muestra que un conjunto de las Ad-citoquinas de fusión descritas son eficaces para el tratamiento de tumores de diversos orígenes (por ejemplo, Ad-m IL-7/IL-2, Ad-mIL-21/mIL-2, Ad-mIFN γ /mIL-2 y Ad-mIL-2/mproIL-18).

Más en particular, los resultados mostrados en los presentes ejemplos muestran que la localización de cada citoquina con respecto a la otra puede influir en la expresión y la actividad biológica, como mínimo, en el sistema adenoviral. En esta consideración, se observó que la secreción y actividad de los grupos IL-2 e IL-18 eran más eficaces

cuando IL-2 se localizaba en el extremo N-terminal de la fusión, (fusión IL-2/IL-18) que cuando IL-2 se localizaba en el extremo C-terminal de IL-18. En cambio, se obtuvieron citoquinas de fusión más eficaces entre IL-2 e IL-7 cuando IL-2 se localizaba en el extremo C-terminal del grupo IL-7 (véase los ejemplos 1 y 2).

Además, se sabe que IL-18 se produce inicialmente en una forma precursora (pro IL-18). El precursor de IL-18 debe separarse por la enzima Caspasa-3/ICE para secretarse (Dinarelo y otros, 1999, Interleukin-18 Methods (Métodos de la Interleuquina 18) 19, 121-132). Los ejemplos 1 y 2 muestran que las citoquinas de fusión que incorporan pro-IL-18 se expresan de manera más eficaz que las que contienen la IL-18 madura. En base a esto, se puede asumir que después de la expresión de la citoquina de fusión IL-2/proIL-18, la pro-IL18 se pliega correctamente y se secreta, presumiblemente como resultado de la secuencia señal asociada a IL-2.

Recientemente, se describió que una mutación de IL-18 (K89A) aumentaba la actividad biológica de IL-18. Las citoquinas de fusión que contienen IL18 (K89A) también muestran una mejora en la funcionalidad de todos los ensayos biológicos analizados. De manera más destacada, el ejemplo 3 muestra que las citoquinas de fusión que contienen IL18 (K89A) muestran adicionalmente una toxicidad relacionada con las citoquinas notablemente reducida, tal como se ha evaluado mediante la inducción con Anexina V, Fas (AICD) o la pérdida vascular (VLS). De manera destacada, la actividad biológica de la citoquina de fusión mL2/mpro-IL18 (K89A) parece mantenerse a una concentración de proteína mucho más baja y, de este modo, menos o nada tóxica, que la requerida para la actividad biológica de las citoquinas individuales. El patrón de toxicidad reducida obtenido con la fusión mL-2/proIL-18 (K89A) puede ser un efecto de la modificación estructural de las citoquinas implicadas en la proteína de fusión. También es posible que la citoquina de fusión murina active una población específica de células efectoras que expresan el receptor de IL-2, reduciendo de este modo la toxicidad aparente de la IL-2 recombinante (Bensinger y otros, 2004, J. Immunol. 172, 5287-5296).

También es conocido que la estimulación de células T de las citoquinas IL-2 o IL-18 individuales para producir IFN γ requiere de la preactivación de células T esplénicas por Con-A (Osaki y otros, 1998, J. Immunol. 160, 1742-1749; Osaki y otros, 1999, Gene Ther. 6, 808-815; Hwang y otros, 2004, Cancer Gene Ther. 11, 397-407). De manera destacada, tal como se muestra en el ejemplo 2, la citoquina de fusión mL-2/mproIL-18 no requiere la preestimulación de células T para esta actividad. De este modo, no sólo se mantienen las actividades biológicas de IL-2 e IL-18 y se reduce la toxicidad relacionada con las citoquinas, sino que la proteína de fusión mL-2/proIL-18 parece tener una actividad nueva que cualquier citoquina individual es incapaz de realizar.

Tal como se ilustra en el ejemplo 4, se ha obtenido una protección antitumoral muy eficaz después de la inyección intratumoral de Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) en todos los modelos de tumores analizados, incluyendo el modelo B16F10 muy agresivo. La actividad antitumoral proporcionada por Ad-mIL-2/mproIL-18 (K89A) era mucho más elevada que la obtenida después de la inyección intratumoral de Ad-IL-2 o Ad-proIL-18 solas o la combinación de las dos construcciones individuales. Los experimentos de depleción demuestran claramente que tanto el sistema inmune innato (células NK) como la respuesta inmune adaptativa (CD8) están implicados en este efecto terapéutico. El análisis inmunohistológico de los tumores inyectados indica que la actividad antitumoral proporcionada por Ad-mIL2/pro-IL18 (K89A) está asociada con la infiltración de células T activadas y células presentadoras de antígeno. De manera sorprendente, los tumores inyectados con Ad (mIL-2/proIL-18 (K89A) son altamente positivos para el factor de von Willebrand, lo que sugiere un aumento de la vascularización. Aunque la vascularización de los tumores está normalmente asociada con un diagnóstico malo, en este caso, se puede asociar con un aumento de la infiltración por las células efectoras inmunes. Además, la citoquina de fusión mL-2/proIL-18 (K89A) desarrolla una actividad de AICD reducida que parece ser crucial en la inducción de células T específicas tumorales (Saff y otros, 2004, J. Immunol. 172, 6598-6606).

En conclusión, en base a los resultados discutidos anteriormente, las citoquinas de fusión de la presente invención presentan un gran potencial tanto para incrementar la actividad terapéutica de las citoquinas como para reducir los efectos secundarios tóxicos.

Aunque la presente invención está definida por las reivindicaciones, la presente solicitud también se refiere a los siguientes puntos:

1. Una proteína de fusión con la fórmula:

(a) X-Y, o

(b) Y-X,

en las que X representa un primer polipéptido inmunoregulador;

Y representa un segundo polipéptido inmunoregulador; y

X es diferente de Y.

2. La proteína de fusión del punto 1, en la que dichos X e Y representan cada uno una citoquina.

3. La proteína de fusión del punto 2, en la que X representa una citoquina capaz de aumentar una respuesta inmune no específica.
4. La proteína de fusión del punto 3, en la que dicha respuesta inmune no específica es mediada por una o más células efectoras seleccionadas del grupo que comprende macrófagos, células dendríticas, células NK y células NKT.
5. La proteína de fusión de cualquiera de los puntos 2 a 4, en la que Y representa una citoquina capaz de aumentar una inmunidad específica.
6. La proteína de fusión del punto 5, en la que dicha inmunidad específica está mediada por las células efectoras B y/o los linfocitos T.
7. La proteína de fusión de cualquiera de los puntos 2 a 6, en la que x e Y son independientemente IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27, IL-31 o IFN γ .
8. La proteína de fusión del punto 7, en la que:
- X es IL-2 e Y se selecciona del grupo que comprende IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, IL-27, IL-31 e IFN γ ;
 - X es IL-12 e Y se selecciona del grupo que comprende IL-15, IL-18 e IL-21;
 - X es IL-15 e Y es IL-7, IL-18 o IL-21; o
 - X es IL-18 e Y es IL-21.
9. La proteína de fusión del punto 8, en la que:
- tiene la fórmula Y-X, en la que X es IL-2 e Y es IL-7;
 - tiene la fórmula X-Y o Y-X, en la que X es IL-2 e Y es IL-15;
 - tiene la fórmula X-Y, en la que X es IL-2 e Y es IL-18;
 - tiene la fórmula Y-X, en la que X es IL-2 e Y es IL-21;
 - tiene la fórmula Y-X, en la que X es IL-2 e Y es IFN-g;
 - tiene la fórmula X-Y, en la que X es IL-15 e Y es IL-7;
 - tiene la fórmula X-Y o Y-X, en la que X es IL-15 e Y es IL-18;
 - tiene la fórmula X-Y o Y-X, en la que X es IL-15 e Y es IL-21; e
 - tiene la fórmula X-Y o Y-X, en la que X es IL-18 e Y es IL-21.
10. La proteína de fusión según cualquiera de los puntos 7 a 9, en la que dicha IL-2 es una variante de IL-2 que muestra una citotoxicidad reducida en comparación con la correspondiente IL-2 nativa.
11. La proteína de fusión del punto 10, en la que dicha variante de IL-2 se selecciona del grupo que comprende:
- la variante F42K que tiene el residuo de fenilalanina en la posición 42 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de lisina;
 - la variante R38A que tiene el residuo de arginina en la posición 38 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de alanina;
 - la variante D20I que tiene el residuo de ácido aspártico en la posición 20 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de isoleucina;
 - la variante N88G que tiene el residuo de asparagina en la posición 88 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de glicina;
 - la variante N88R que tiene el residuo de asparagina en la posición 88 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de arginina;
 - la variante Q126M que tiene el residuo de glutamina en la posición 126 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de metionina; y

(g) cualquier combinación de (a) a (f).

12. La proteína de fusión según cualquiera de los puntos 7 a 11, en la que dicha IL-18 es una variante de IL-18.

13. La proteína de fusión del punto 12, en la que dicha variante de IL-18 es la variante K89A que tiene el residuo de lisina en la posición 89 de la correspondiente IL-18 nativa sustituido por un residuo de alanina.

14. La proteína de fusión de cualquiera de los puntos 7 a 13, en la que dicha IL-18 es una proIL-18.

15. La proteína de fusión de cualquiera de los puntos 7 a 14, en la que dicha proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es, como mínimo, el 70% homóloga a toda o parte de cualquiera de las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEC ID NO: 1-19.

16. La proteína de fusión del punto 15, en la que dicha proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es el 100% homóloga a toda o parte de cualquiera de las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEC ID NO: 1-19.

17. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de cualquiera de los puntos 1 a 16.

18. Un vector que contiene la molécula de ácido nucleico del punto 17.

19. El vector del punto 18, en el que dicho vector deriva de uno o más plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, cromosomas artificiales, o de virus seleccionados del grupo que comprende baculovirus, papovavirus, virus del herpes, adenovirus, virus asociados a adenovirus (AAV), poxvirus, virus espumosos y retrovirus.

20. El vector del punto 19, en el que dicho vector es un vector adenoviral.

21. El vector del punto 20, en el que dicho vector es un vector adenoviral defectuoso en la replicación con E1 y E3 eliminadas que comprende la molécula de ácido nucleico según el punto 17 insertada en sustitución de la región E1 y situada bajo el control del promotor de CMV.

22. El vector de cualquiera de los puntos 18 a 21, en el que dicho vector comprende además uno o más transgenes que codifican (i) un inhibidor de la proliferación de tumores y/o (ii) como mínimo, un antígeno contra el que se desea una respuesta inmune.

23. El vector del punto 22, en el que dicho inhibidor de la proliferación de tumores es una proteína de fusión que codifica una enzima de dos dominios que posee las actividades de CDasa y UPR Tasa.

24. El vector del punto 22, en el que dicho antígeno específico es un antígeno de HPV seleccionado del grupo que comprende E5, E6, E7, L1 y L2, ya sea de forma individual o en combinación.

25. El vector del punto 24, en el que dicho antígeno de HPV es una forma anclada a membrana de una variante no oncogénica del antígeno temprano E6 y/o E7 de HPV-16.

26. Una partícula viral infecciosa que comprende una molécula de ácido nucleico según el punto 17 o un vector según cualquiera de los puntos 18 a 25.

27. Un proceso para la producción de una partícula viral infecciosa según el punto 26, que comprende las etapas de:

(a) introducir el vector viral de cualquiera de los puntos 18 a 25 en una línea celular adecuada,

(b) cultivar dicha línea celular en condiciones adecuadas para permitir la producción de dicha partícula viral infecciosa, y

(c) recuperar la partícula viral infecciosa producida del cultivo de dicha línea celular, y

(d) de manera opcional, purificar dicha partícula viral infecciosa recuperada.

28. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico según el punto 17 o el vector según cualquiera de los puntos 18 a 25 o la partícula viral infecciosa del punto 26.

29. Un método para la producción de la proteína de fusión según cualquiera de los puntos 1 a 16, que comprende introducir un vector según cualquiera de los puntos 18 a 25 o una partícula viral infecciosa según el punto 26 en una célula huésped adecuada para producir una célula huésped transfectada o infectada, cultivar *in vitro* dicha célula huésped transfectada o infectada en condiciones adecuadas para el crecimiento de la célula huésped, y, a continuación,

recuperar dicha proteína de fusión de dicho cultivo y, de manera opcional, purificar dicha proteína de fusión recuperada.

5 30. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la proteína de fusión según cualquiera de los puntos 1 a 16, el vector según cualquiera de los puntos 18 a 25, la partícula viral infecciosa según el punto 26, la célula huésped según el punto 28 o cualquier combinación de los mismos, y, de manera opcional, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 31. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de los puntos 1 a 16, el vector según cualquiera de los puntos 18 a 25, la partícula viral infecciosa según el punto 26, la célula huésped según el punto 28 o la composición según el punto 30, para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento o la prevención de un cáncer o una enfermedad infecciosa.

10 32. La utilización según el punto 31, en la que dicha composición se administra en un tumor sólido o próximo al mismo.

15 33. La utilización del punto 31 ó 32, en la que dicha proteína de fusión, dicho vector, dicha partícula viral infecciosa, dicha célula huésped o dicha composición se administran en combinación con uno o más transgenes o productos de transgenes.

15 34. Un método para el tratamiento de un organismo humano o animal, que comprende administrar a dicho organismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión según cualquiera de los puntos 1 a 16, el vector según cualquiera de los puntos 18 a 25, la partícula viral infecciosa según el punto 26, la célula huésped según el punto 28 o la composición según el punto 30.

20 35. Un método para aumentar una respuesta inmune en un organismo animal o humano que comprende introducir en dicho organismo la proteína de fusión según cualquiera de los puntos 1 a 16, el vector según cualquiera de los puntos 18 a 25, la partícula viral infecciosa según el punto 26, la célula huésped según el punto 28 o la composición según el punto 30, para aumentar dicha respuesta inmune.

25 36. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de los puntos 1 a 16, el vector según cualquiera de los puntos 18 a 25, la partícula viral infecciosa según el punto 26, la célula huésped según el punto 28 o la composición según el punto 30, para la preparación de un fármaco destinado al objetivo de activar la maduración de células dendríticas en un organismo animal o humano.

25 37. La utilización según el punto 36, en la que la proteína de fusión presenta la fórmula X-Y, en la que X es IL-2 e Y es IL-18 o la fórmula Y-X, en la que X es IL-2 e Y es IL-7.

30 38. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de los puntos 1 a 16, el vector según cualquiera de los puntos 18 a 25, la partícula viral infecciosa según el punto 26, la célula huésped según el punto 28 o la composición según el punto 30, para la preparación de un fármaco destinado al objetivo de activar células NKT en un organismo animal o humano.

30 39. La utilización según el punto 38, en la que la proteína de fusión presenta la fórmula X-Y, en la que X es IL-2 e Y es IL-18.

35 40. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de los puntos 1 a 16, el vector según cualquiera de los puntos 18 a 25, la partícula viral infecciosa según el punto 26, la célula huésped según el punto 28 o la composición según el punto 30, para la preparación de un fármaco que proporciona una citotoxicidad menor tras la administración en un organismo animal o humano en comparación con la citotoxicidad observada tras la administración de los grupos X y/o Y al paciente.

40 41. La utilización según el punto 40, en la que la proteína de fusión presenta la fórmula X-Y, en la que X es IL-2 e Y es IL-18, o la fórmula Y-X, en la que X es IL-2 e Y es IL-7.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> TRANSGENE S.A.
- <120> Citoquinas multifuncionales nuevas
- <130> H2216 PCT S3
- 5 <140> PCT/EP2004/008114
- <141> 2004-07-20
- <150> EP 03 36 0086.7
- <151> 2003-07-21
- <150> US 60/539,320
- 10 <151> 2004-01-28
- <160> 59
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 345
- 15 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <221> origen
- <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-7 humana/enlazador/IL-2 humana"
- 20 <400> 1

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
 25 20 25 30
 Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
 35 40 45
 Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
 50 55 60
 30 Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
 65 70 75 80
 Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
 85 90 95
 Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
 35 100 105 110
 Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
 115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
 130 135 140
 Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
 145 150 155 160
 5 Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
 165 170 175
 His Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 180 185 190
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 10 195 200 205
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 210 215 220
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 225 230 235 240
 15 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 245 250 255
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 260 265 270
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 20 275 280 285
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 290 295 300
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 305 310 315 320
 25 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 325 330 335
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 340 345
 <210> 2
 30 <211> 333
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 35 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-7 murina/enlazador/IL-2 murina"
 <400> 2
 Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile

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

Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp
 305 310 315 320
 Ile Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln
 325 330

5 <210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 10 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 humana/enlazador/IL-15 humana"
 <400> 3

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

15 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

20 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

25 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

30 130 135 140
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu
 165 170 175

35 Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His
 180 185 190
 Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser

195 200 205
Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp
210 215 220
Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr
5 225 230 235 240
Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met
245 250 255
Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp
260 265 270
10 Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn
275 280 285
Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys
290 295 300
Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val
15 305 310 315 320
His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
325 330
<210> 4
<211> 330
20 <212> PRT
<213> secuencia artificial
<220>
<221> origen
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-15 humana/enlazador/IL-2 humana"
25 <400> 4
Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1 5 10 15
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
20 25 30
30 Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
35 40 45
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
50 55 60
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
35 65 70 75 80
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85 90 95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 100 105 110
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 115 120 125
 5 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 130 135 140
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 10 165 170 175
 Ser Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala
 180 185 190
 Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln
 195 200 205
 15 Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly
 210 215 220
 Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys
 225 230 235 240
 Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu
 20 245 250 255
 Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
 260 265 270
 Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val
 275 280 285
 25 Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr
 290 295 300
 Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr
 305 310 315 320
 Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 30 325 330
 <210> 5
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 señal/IL-15 humana/enlazador/IL-2 humana"

<400> 5

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser

5 20 25 30

Ile Gln Cys Tyr Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu

35 40 45

Ala Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro

50 55 60

10 Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu

85 90 95

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu

15 100 105 110

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His

115 120 125

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser

130 135 140

20 Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu

145 150 155 160

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln

165 170 175

Met Phe Ile Asn Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

25 180 185 190

Gly Gly Gly Gly Ser Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala

195 200 205

Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr

210 215 220

30 Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met

225 230 235 240

Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met

245 250 255

Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His

35 260 265 270

Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn

275 280 285

Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser
 290 295 300
 Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe
 305 310 315 320
 5 Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn
 325 330 335
 Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 340 345 350
 <210> 6
 10 <211> 324
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 15 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 murina/enlazador/IL-15 murina"
 <400> 6
 Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala
 20 20 25 30
 Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu
 35 40 45
 Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn
 50 55 60
 25 Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu
 65 70 75 80
 Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu
 85 90 95
 Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe
 30 100 105 110
 Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val
 115 120 125
 Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp
 130 135 140
 35 Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys
 145 150 155 160
 Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

165 170 175
 Gly Gly Ser Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr
 180 185 190
 Leu Val Leu Leu Val Asn Ser Ala Gly Ala Asn Trp Ile Asp Val Arg
 5 195 200 205
 Tyr Asp Leu Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile Gln Ser Ile His Ile Asp
 210 215 220
 Thr Thr Leu Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His Pro Ser Cys Lys Val Thr
 225 230 235 240
 10 Ala Met Asn Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Leu His Glu Tyr
 245 250 255
 Ser Asn Met Thr Leu Asn Glu Thr Val Arg Asn Val Leu Tyr Leu Ala
 260 265 270
 Asn Ser Thr Leu Ser Ser Asn Lys Asn Val Ala Glu Ser Gly Cys Lys
 15 275 280 285
 Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Thr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Ser
 290 295 300
 Phe Ile Arg Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Asp Tyr Lys Asp
 305 310 315 320
 20 Asp Asp Asp Lys

 <210> 7
 <211> 324
 <212> PRT
 25 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-15 murina/enlazador/IL-2 murina"
 <400> 7
 30 Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Asn Ser Ala Gly Ala Asn Trp Ile Asp Val Arg Tyr Asp Leu
 20 25 30
 Glu Lys Ile Glu Ser Leu Ile Gln Ser Ile His Ile Asp Thr Thr Leu
 35 35 40 45
 Tyr Thr Asp Ser Asp Phe His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Asn
 50 55 60

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

 35 <210> 8
 <211> 361
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 humana/enlazador/pro IL-18 humana"

5

<220>

<400> 8

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu

10

20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

50 55 60

15

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu

65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

20

100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala

115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

130 135 140

25

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp

165 170 175

Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr

30

180 185 190

Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys

195 200 205

Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu

210 215 220

35

Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser

225 230 235 240

Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr

245 250 255
 Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys
 260 265 270
 Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys
 5 275 280 285
 Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile
 290 295 300
 Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu
 305 310 315 320
 10 Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp
 325 330 335
 Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser
 340 345 350
 Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 15 355 360
 <210> 9
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 humana/enlazador/pro IL-18 K89A humana"
 <400> 9
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 25 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 30 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 35 85 90 95
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140

5 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp
 165 170 175

Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr
 10 180 185 190

Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys
 195 200 205

Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu
 210 215 220

15 Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser
 225 230 235 240

Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr
 245 250 255

Ala Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys
 20 260 265 270

Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys
 275 280 285

Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile
 290 295 300

25 Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp
 325 330 335

Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser
 30 340 345 350

Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 355 360

<210> 10
 <211> 325
 35 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>

<221> origen

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 humana/enlazador/IL-18 humana madura"

<400> 10

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

5 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu

20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile

35 40 45

10 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu

65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

15 85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala

115 120 125

20 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys

25 165 170 175

Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln

180 185 190

Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp

195 200 205

30 Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln

210 215 220

Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser

225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro

35 245 250 255

Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg

260 265 270

Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr
 275 280 285

Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu
 290 295 300

5 Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr
 305 310 315 320

Val Gln Asn Glu Asp
 325

<210> 11

10 <211> 325
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen

15 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 humana/enlazador/IL-18 K89A humana madura"
 <400> 11

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60

25 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 30 100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140

35 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys

165 170 175
 Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln
 180 185 190
 Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp
 5 195 200 205
 Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Ala Asp Ser Gln
 210 215 220
 Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser
 225 230 235 240
 10 Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro
 245 250 255
 Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg
 260 265 270
 Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr
 15 275 280 285
 Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu
 290 295 300
 Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr
 305 310 315 320
 20 Val Gln Asn Glu Asp
 325
 <210> 12
 <211> 371
 <212> PRT
 25 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 murina/enlazador/pro-IL-18 murina"
 <400> 12
 30 Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala
 20 25 30
 Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu
 35 35 40 45
 Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn
 50 55 60

Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu
 65 70 75 80
 Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu
 85 90 95
 5 Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe
 100 105 110
 Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val
 115 120 125
 Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp
 10 130 135 140
 Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys
 145 150 155 160
 Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 165 170 175
 15 Gly Gly Ser Met Ala Ala Met Ser Glu Asp Ser Cys Val Asn Phe Lys
 180 185 190
 Glu Met Met Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Pro Glu Glu Asn
 195 200 205
 Gly Asp Leu Glu Ser Asp Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala
 20 210 215 220
 Val Ile Arg Asn Ile Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln
 225 230 235 240
 Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro
 245 250 255
 25 Gln Thr Arg Leu Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly
 260 265 270
 Leu Ala Val Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser
 275 280 285
 Cys Lys Asn Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn
 30 290 295 300
 Ile Asp Asp Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro
 305 310 315 320
 Gly His Asn Lys Met Glu Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe
 325 330 335
 35 Leu Ala Cys Gln Lys Glu Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
 340 345 350
 Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu

355 360 365
 His Gln Ser
 370
 <210> 13
 5 <211> 371
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 murina/enlazador/pro IL-18 K89A murina"
 <400> 13
 Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala
 15 20 25 30
 Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu
 35 40 45
 Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn
 50 55 60
 20 Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu
 65 70 75 80
 Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu
 85 90 95
 Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe
 25 100 105 110
 Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val
 115 120 125
 Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp
 130 135 140
 30 Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys
 145 150 155 160
 Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 165 170 175
 Gly Gly Ser Met Ala Ala Met Ser Glu Asp Ser Cys Val Asn Phe Lys
 35 180 185 190
 Glu Met Met Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Pro Glu Glu Asn
 195 200 205

Gly Asp Leu Glu Ser Asp Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala
 210 215 220

Val Ile Arg Asn Ile Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln
 225 230 235 240

5 Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro
 245 250 255

Gln Thr Arg Leu Ile Ile Tyr Met Tyr Ala Asp Ser Glu Val Arg Gly
 260 265 270

Leu Ala Val Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser
 10 275 280 285

Cys Lys Asn Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn
 290 295 300

Ile Asp Asp Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro
 305 310 315 320

15 Gly His Asn Lys Met Glu Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe
 325 330 335

Leu Ala Cys Gln Lys Glu Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
 340 345 350

Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu
 20 355 360 365

His Gln Ser
 370

<210> 14
 <211> 336

25 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 murina/enlazador/IL-18 murina madura"

30 <400> 14

Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu
 1 5 10 15

Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala
 20 25 30

35 Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu
 35 40 45

Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn

50 55 60
 Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu
 65 70 75 80
 Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu
 5 85 90 95
 Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe
 100 105 110
 Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val
 115 120 125
 10 Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp
 130 135 140
 Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys
 145 150 155 160
 Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 15 165 170 175
 Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg
 180 185 190
 Asn Ile Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe
 195 200 205
 20 Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg
 210 215 220
 Leu Ile Ile Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val
 225 230 235 240
 Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn
 25 245 250 255
 Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp
 260 265 270
 Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn
 275 280 285
 30 Lys Met Glu Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys
 290 295 300
 Gln Lys Glu Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu
 305 310 315 320
 Asn Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
 35 325 330 335
 <210> 15
 <211> 336

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> origen

5 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-2 murina/enlazador/IL-18 K89A murina madura"

<400> 15

Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu

1 5 10 15

Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala

10 20 25 30

Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu

35 40 45

Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn

50 55 60

15 Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu

65 70 75 80

Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu

85 90 95

Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe

20 100 105 110

Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val

115 120 125

Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp

130 135 140

25 Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys

145 150 155 160

Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

165 170 175

Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg

30 180 185 190

Asn Ile Asn Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe

195 200 205

Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg

210 215 220

35 Leu Ile Ile Tyr Met Tyr Ala Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val

225 230 235 240

Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn

245 250 255
 Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp
 260 265 270
 Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn
 5 275 280 285
 Lys Met Glu Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys
 290 295 300
 Gln Lys Glu Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu
 305 310 315 320
 10 Asn Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
 325 330 335
 <210> 16
 <211> 347
 <212> PRT
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-21 humana/enlazador/IL-2 humana"
 <400> 16
 20 Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu
 1 5 10 15
 Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala
 20 25 30
 Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln
 25 35 40 45
 Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
 50 55 60
 Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
 65 70 75 80
 30 His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
 85 90 95
 Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln
 100 105 110
 Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg
 35 115 120 125
 Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn
 130 135 140

Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
 145 150 155 160
 Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
 165 170 175
 5 Ala Cys Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 180 185 190
 Gly Ser Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu
 195 200 205
 Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr
 10 210 215 220
 Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 225 230 235 240
 Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe
 245 250 255
 15 Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys
 260 265 270
 Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln
 275 280 285
 Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
 20 290 295 300
 Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
 325 330 335
 25 Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 340 345
 <210> 17
 <211> 325
 <212> PRT
 30 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IL-21 murina/enlazador/IL-2 murina"
 <400> 17
 35 Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val
 1 5 10 15
 Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu

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

Ser Thr Ser Pro Gln

325

<210> 18

<211> 334

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota= "Decripción de la secuencia artificial: fusión IFN-g humana/enlazador/IL-2 humana"

10 <400> 18

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu

1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu

20 25 30

15 Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn

35 40 45

Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp

50 55 60

Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe

20 65 70 75 80

Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile

85 90 95

Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg

100 105 110

25 Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val

115 120 125

Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser

130 135 140

Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg

30 145 150 155 160

Gly Arg Arg Ala Ser Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

165 170 175

Gly Gly Gly Gly Ser Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala

180 185 190

35 Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr

195 200 205

Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met

210 215 220
 Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met
 225 230 235 240
 Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His
 5 245 250 255
 Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn
 260 265 270
 Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser
 275 280 285
 10 Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe
 290 295 300
 Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn
 305 310 315 320
 Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 15 325 330
 <210> 19
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: fusión IFN-g murina/enlazador/IL-2 murina"
 <400> 19
 Met Asn Ala Thr His Cys Ile Leu Ala Leu Gln Leu Phe Leu Met Ala
 25 1 5 10 15
 Val Ser Gly Cys Tyr Cys His Gly Thr Val Ile Glu Ser Leu Glu Ser
 20 25 30
 Leu Asn Asn Tyr Phe Asn Ser Ser Gly Ile Asp Val Glu Glu Lys Ser
 35 40 45
 30 Leu Phe Leu Asp Ile Trp Arg Asn Trp Gln Lys Asp Gly Asp Met Lys
 50 55 60
 Ile Leu Gln Ser Gln Ile Ile Ser Phe Tyr Leu Arg Leu Phe Glu Val
 65 70 75 80
 Leu Lys Asp Asn Gln Ala Ile Ser Asn Asn Ile Ser Val Ile Glu Ser
 35 85 90 95
 His Leu Ile Thr Thr Phe Phe Ser Asn Ser Lys Ala Lys Lys Asp Ala
 100 105 110

Phe Met Ser Ile Ala Lys Phe Glu Val Asn Asn Pro Gln Val Gln Arg
 115 120 125
 Gln Ala Phe Asn Glu Leu Ile Arg Val Val His Gln Leu Leu Pro Glu
 130 135 140
 5 Ser Ser Leu Arg Lys Arg Lys Arg Ser Arg Cys Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Ser Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr
 165 170 175
 Leu Thr Leu Val Leu Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr
 10 180 185 190
 Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 195 200 205
 Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu
 210 215 220
 15 Ser Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Phe Lys Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln
 245 250 255
 Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr
 20 260 265 270
 Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn
 275 280 285
 Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu
 290 295 300
 25 Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg
 305 310 315 320
 Trp Ile Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln
 325 330
 <210> 20
 30 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 35 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de IL-2 murina"
 <400> 20
 cggaattcca cagtgacctc aagtcc

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de IL-2 murina"
 <400> 21
 ggggtacccc ttatgtgtg taag 24
 10 <210> 22
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de la variante N88G de IL-2 murina"
 <400> 22
 gagaatttca tcagcggat cagagtaact gttg 34
 20 <210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de la variante N88G de IL-2 murina"
 <400> 23
 caacagttac tctgataccg ctgatgaaat tctc 34
 30 <210> 24
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 35 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de la variante N88R de IL-2 murina"
 <400> 24

- gagaatttca tcagccgtat cagagtaact gttg 34
 <210> 25
 <211> 34
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de la variante N88R de IL-2 murina"
 10 <400> 25
 caacagttac tctgatacgg ctgatgaaat tctc 34
 <210> 26
 <211> 43
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de la variante Q126M de IL-2 murina"
 20 <400> 26
 ggagatggat agccttctgt atgagcatca tctcaacaag ccc 43
 <210> 27
 <211> 43
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de la variante Q126M de IL-2 murina"
 30 <400> 27
 gggcttggtg agatgatgct catacagaag gctatccatc tcc 43
 <210> 28
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de la variante D20I de IL-2"

murina"
 <400> 28
 gagcagctgt tgatgatcct acaggag 27
 <210> 29
 5 <211> 27
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de la variante D20I de IL-2 murina"
 <400> 29
 ctctgtagg atcatcaaca gctgctc 27
 <210> 30
 15 <211> 35
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 20 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de IL-7 murina"
 <400> 30
 ccgctcgagc ggatgtcca tgttctttt agata 35
 <210> 31
 <211> 33
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de IL-7 murina"
 30 <400> 31
 cgggtaccc cggtatatac tgccttcaa aat 33
 <210> 32
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen

- <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de IL-18 murina"
 <400> 32
 ccgctcgagc ggatggctgc catgacagaa ga 32
 <210> 33
 5 <211> 43
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
- 10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de IL-18 murina"
 <400> 33
 cggggtaccc cgctaacttt gatgtaagtt agtgagagtg aac 43
 <210> 34
 <211> 43
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
- 20 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de la variante K89A de IL-18 murina"
 <400> 34
 ccagactgat aatatacatg tacgcagaca gtgaagtaag agg 43
 <210> 35
 <211> 43
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
- 30 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de la variante K89A de IL-18 murina"
 <400> 35
 cctcttactt cactgtctgc gtacatgtat attatcagtc tgg 43
 <210> 36
 <211> 50
 35 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

<221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de IL-18 murina madura"
 <400> 36
 ggtggaggcg gtcaggcgg aggtggctct aacttggcc gacttactg 50

5 <210> 37
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

10 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de IL-18 murina madura"
 <400> 37
 ctaacttga tgtaagttag tgagagtgaa c 31
 <210> 38

15 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

20 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de IL-21 murina"
 <400> 38
 ccgctcgagc ggatggagag gaccctgtc tg 32
 <210> 39
 <211> 37

25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

30 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de IL-21 murina"
 <400> 39
 cggggtaccc cgctaggaga gatgctgatg aatcatc 37
 <210> 40
 <211> 32
 <212> ADN

35 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen

<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido para la clonación de IL-15 murina"
 <400> 40
 ccgctcgagc ggatgtacag catgcagctc gc 32
 <210> 41
 5 <211> 31
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador antisentido para la clonación de IL-15 murina"
 <400> 41
 cgggtaccc cgctactgt catcgtcgtc c 31
 <210> 42
 <211> 32
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador 5' para la generación de la fusión mL2/IL18"
 20 <400> 42
 ccgctcgagc ggatgtacag catgcagctc ga 32
 <210> 43
 <211> 50
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 5' para la generación de la fusión IIL2/IL18"
 <400> 43
 30 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct atggctgcca tgtcagaaga 50
 <210> 44
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 3' para la generación de la fusión mL2/IL18"

<400> 44
 agagccacct cgcctgaac cgcctccacc ttgagggctt gttgagatga 50
 <210> 45
 <211> 49
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 5' para la generación de la fusión mL18/IL2"
 10 <400> 45
 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct atgtacagca tgcagctcg 49
 <210> 46
 <211> 60
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 3' para la generación de la fusión mL18/IL2"
 <400> 46
 20 agagccacct cgcctgaac cgcctccacc acttgatgt aagttagta gagtgaacat 60
 <210> 47
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador 3' para la generación de la fusión mL18/IL2"
 <400> 47
 cggggtacct cggtattgag ggctgttga g 31
 30 <210> 48
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 35 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: secuencia para la generación de la fusión mL2/IL18 madura"
 <400> 48

ggtggaggcg gtcaggcgg aggtggctct aacttggcc gacttactg 50
 <210> 49
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador 3' para la generación de la fusión mL2/IL18 madura"
 <400> 49
 10 ctaacttga tgtaagttag tgagagtgaa c 31
 <210> 50
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 5' para la generación de la fusión mL2/IL7"
 <400> 50
 ggtggaggcg gtcaggcgg aggtggctct atgtccatg tttctttag 50
 20 <210> 51
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 25 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 3' para la generación de la fusión mL7/IL2"
 <400> 51
 agagccacct cgcctgaac cgcctccacc tatactgcc tcaaaatt 49
 <210> 52
 30 <211> 50
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 35 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 5' para la generación de la fusión mL2/IL21"
 <400> 52
 ggtggaggcg gtcaggcgg aggtggctct atggagagga ccctgtctg 50

<210> 53
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 3' para la generación de la fusión mL21/IL2"
 <400> 53
 agagccacct ccgctgaac cgctccacc ggagagatgc tgatgaatca tc 52
 10 <210> 54
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 5' para la generación de la fusión mL2/IFNg"
 <400> 54
 ggtggaggcg gtcaggcgg aggtggctct atgaacgcta cacactgcat cttgg 55
 <210> 55
 20 <211> 33
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 25 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: secuencia para la generación de la fusión mL2/IFNg"
 <400> 55
 cgggtaccc cgctcagcgc gactcctttt ccg 33
 <210> 56
 <211> 37
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador 5' para la clonación de la fusión mLIFNg/IL2"
 35 <400> 56
 ccgctcgagc ggatgaacgc tacacactgc atcttgg 37
 <210> 57

<211> 49
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 5 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 3' para la generación de la fusión mIFNg/IL2"
 <400> 57
 agagccacct ccgcctgaac cgctccacc gcagcgactc ctttccgc 49
 <210> 58
 10 <211> 50
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 15 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 5' para la generación de la fusión mL2/IL15"
 <400> 58
 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct atgtacagca tgcagctcgc 50
 <210> 59
 <211> 49
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: cebador enlazador 3' para la generación de la fusión mL15/IL2"
 25 <400> 59
 agagccacct ccgcctgaac cgctccacc cttgtcatcg tcgtccttg 49

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión con la fórmula:

X-Y,

en la que X representa IL-2 e Y representa IL-18.

5 2. Proteína de fusión, según la reivindicación 2, en la que dicha IL-2 es una variante de IL-2 seleccionada del grupo que comprende:

(a) la variante F42K que tiene el residuo de fenilalanina en la posición 42 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de lisina;

10 (b) la variante R38A que tiene el residuo de arginina en la posición 38 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de alanina;

(c) la variante D20I que tiene el residuo de ácido aspártico en la posición 20 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de isoleucina;

15 (d) la variante N88G que tiene el residuo de asparagina en la posición 88 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de glicina;

(e) la variante N88R que tiene el residuo de asparagina en la posición 88 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de arginina;

(f) la variante Q126M que tiene el residuo de glutamina en la posición 126 de la IL-2 nativa sustituido por un residuo de metionina; y

(g) cualquier combinación de (a) a (f).

20 3. Proteína de fusión según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicha IL-18 es una variante de IL-18 seleccionada del grupo que comprende:

(a) la variante E42A que tiene el residuo de ácido glutámico en la posición 42 de la IL-18 nativa sustituido por un residuo de alanina;

25 (b) la variante K89A que tiene el residuo de lisina en la posición 89 de la IL-18 nativa sustituido por un residuo de alanina; y

(c) una variante que combina ambas sustituciones de (a) y (b).

4. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha IL-18 es una proIL-18.

30 5. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es, como mínimo, el 70% idéntica con la secuencia de aminoácidos indicada en las SEC ID NO: 8 a 15.

6. Proteína de fusión, según la reivindicación 5, en la que dicha proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es el 100% idéntica con la secuencia de aminoácidos indicada en las SEC ID NO: 8 a 15.

35 7. Molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Vector que contiene la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.

40 9. Vector, según la reivindicación 8, en el que dicho vector deriva de uno o más plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, cromosomas artificiales, o de virus seleccionados del grupo que comprende baculovirus, papovavirus, virus del herpes, adenovirus, virus asociados a adenovirus (AAV), poxvirus, virus espumosos y retrovirus.

10. Vector, según la reivindicación 9, en el que dicho vector es un vector adenoviral.

45 11. Vector, según la reivindicación 10, en el que dicho vector es un vector adenoviral defectuoso en la replicación con E1 y E3 eliminadas que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7 insertada en sustitución de la región E1 y situada bajo el control del promotor de CMV.

12. Vector, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicho vector comprende

además uno o más transgenes que codifican (i) un inhibidor de la proliferación de tumores y/o (ii) como mínimo, un antígeno contra el que se desea una respuesta inmune.

5 13. Vector, según la reivindicación 12, en el que dicho inhibidor de la proliferación de tumores es una proteína de fusión que codifica una enzima de dos dominios que posee las actividades de citosín desaminasa y uracil fosforibosil transferasa.

14. Vector, según la reivindicación 12 ó la reivindicación 13, en el que dicho antígeno específico es un antígeno de HPV seleccionado del grupo que comprende E5, E6, E7; L1 y L2, ya sea de forma individual o en combinación.

10 15. Vector, según la reivindicación 14, en el que dicho antígeno de HPV es una forma anclada a membrana de una variante no oncogénica del antígeno temprano E6 y/o E7 de HPV-16.

16. Partícula viral infecciosa que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7 o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15.

17. Proceso para la producción de una partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, que comprende las etapas de:

15 (a) introducir el vector viral según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 en una línea celular adecuada,

(b) cultivar dicha línea celular en condiciones adecuadas para permitir la producción de dicha partícula viral infecciosa, y

(c) recuperar la partícula viral infecciosa producida del cultivo de dicha línea celular, y

20 (d) de manera opcional, purificar dicha partícula viral infecciosa recuperada.

18. Célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7 o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 o la partícula viral infecciosa según la reivindicación 16.

25 19. Método para la producción de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende introducir un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 o una partícula viral infecciosa según la reivindicación 16 en una célula huésped adecuada para producir una célula huésped transfectada o infectada, cultivar *in vitro* dicha célula huésped transfectada o infectada en condiciones adecuadas para el crecimiento de la célula huésped, y, a continuación, recuperar dicha proteína de fusión de dicho cultivo y, de manera opcional, purificar dicha proteína de fusión recuperada.

30 20. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, la partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, la célula huésped según la reivindicación 18 o cualquier combinación de los mismos, y, de manera opcional, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 21. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, la partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, la célula huésped según la reivindicación 18 o la composición según la reivindicación 20, para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento o la prevención de un cáncer o una enfermedad infecciosa.

40 22. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, célula huésped según la reivindicación 18 o composición según la reivindicación 20, para la utilización en el tratamiento o la prevención de un cáncer o una enfermedad infecciosa.

23. Utilización, según la reivindicación 21, o proteína de fusión, vector, partícula viral infecciosa, célula huésped o composición, según la reivindicación 22, en la que dicho fármaco, proteína de fusión, vector, partícula viral infecciosa, célula huésped o composición se administran en un tumor sólido o próximo al mismo.

45 24. Utilización, según la reivindicación 21 o la reivindicación 23, o proteína de fusión, vector, partícula viral infecciosa, célula huésped o composición, según la reivindicación 22, en la que dicho fármaco, proteína de fusión, vector, partícula viral infecciosa, célula huésped o composición se administran en combinación con uno o más transgenes o productos de transgenes.

50 25. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, la partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, la célula huésped según la reivindicación 18 o la composición según la reivindicación 20, para la preparación de un fármaco para aumentar una respuesta inmune.

26. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, célula huésped según la reivindicación 18 o composición según la reivindicación 20, para utilizar en el aumento de una respuesta inmune.
- 5 27. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, la partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, la célula huésped según la reivindicación 18 o la composición según la reivindicación 20, para la preparación de un fármaco destinado al objetivo de activar la maduración de células dendríticas en un organismo animal o humano.
- 10 28. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, célula huésped según la reivindicación 18 o composición según la reivindicación 20, para utilizar en la activación de la maduración de células dendríticas en un organismo animal o humano.
- 15 29. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, la partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, la célula huésped según la reivindicación 18 o la composición según la reivindicación 20, para la preparación de un fármaco destinado al objetivo de activar células NKT en un organismo animal o humano.
30. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, célula huésped según la reivindicación 18 o composición según la reivindicación 20, para utilizar en la activación de células NKT en un organismo animal o humano.
- 20 31. Utilización de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, la partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, la célula huésped según la reivindicación 18 o la composición según la reivindicación 20, para la preparación de un fármaco que proporciona una citotoxicidad menor tras la administración en un organismo animal o humano en comparación con la citotoxicidad observada tras la administración de los grupos X y/o Y al paciente.
- 25 32. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, partícula viral infecciosa según la reivindicación 16, célula huésped según la reivindicación 18 o composición según la reivindicación 20, para proporcionar una citotoxicidad menor tras la administración en un organismo animal o humano en comparación con la citotoxicidad observada tras la administración de los grupos X y/o Y al paciente.

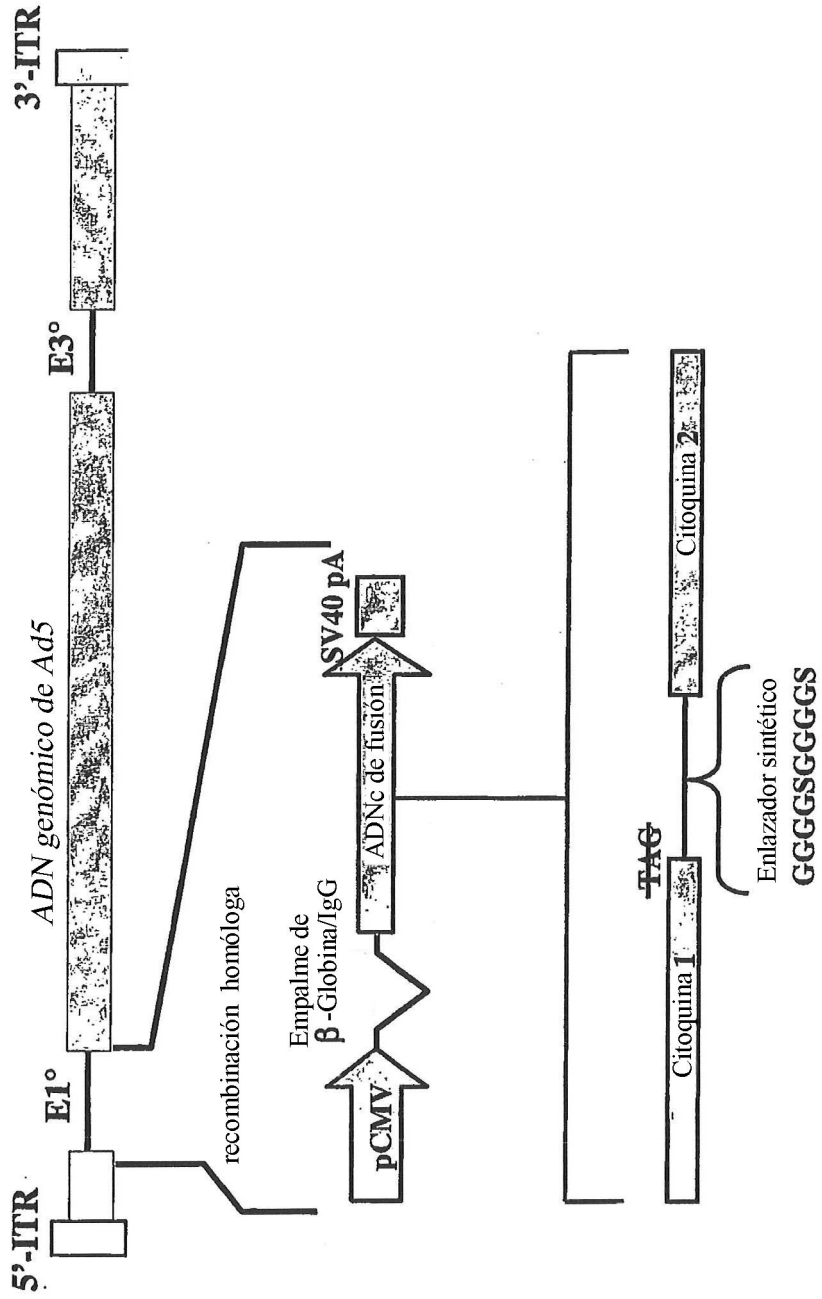


Figura 1

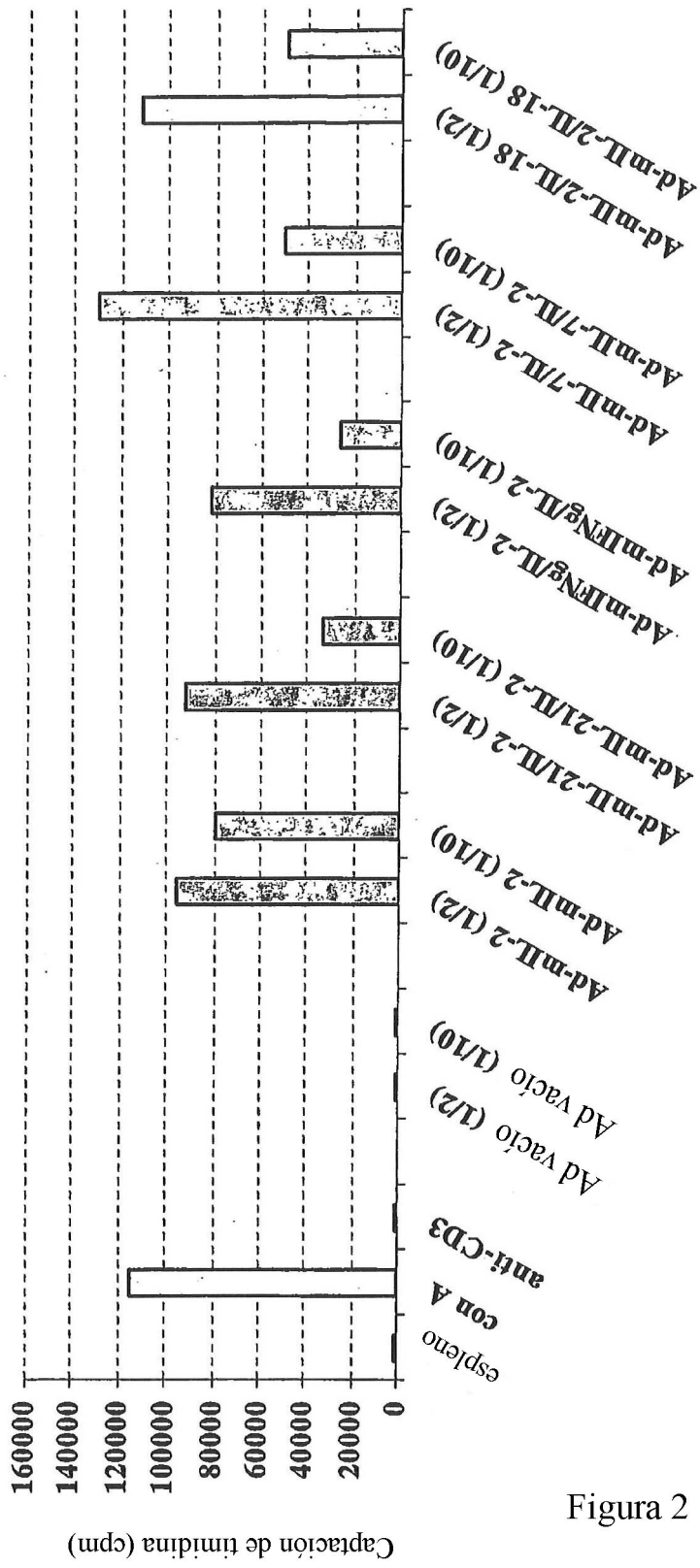


Figura 2

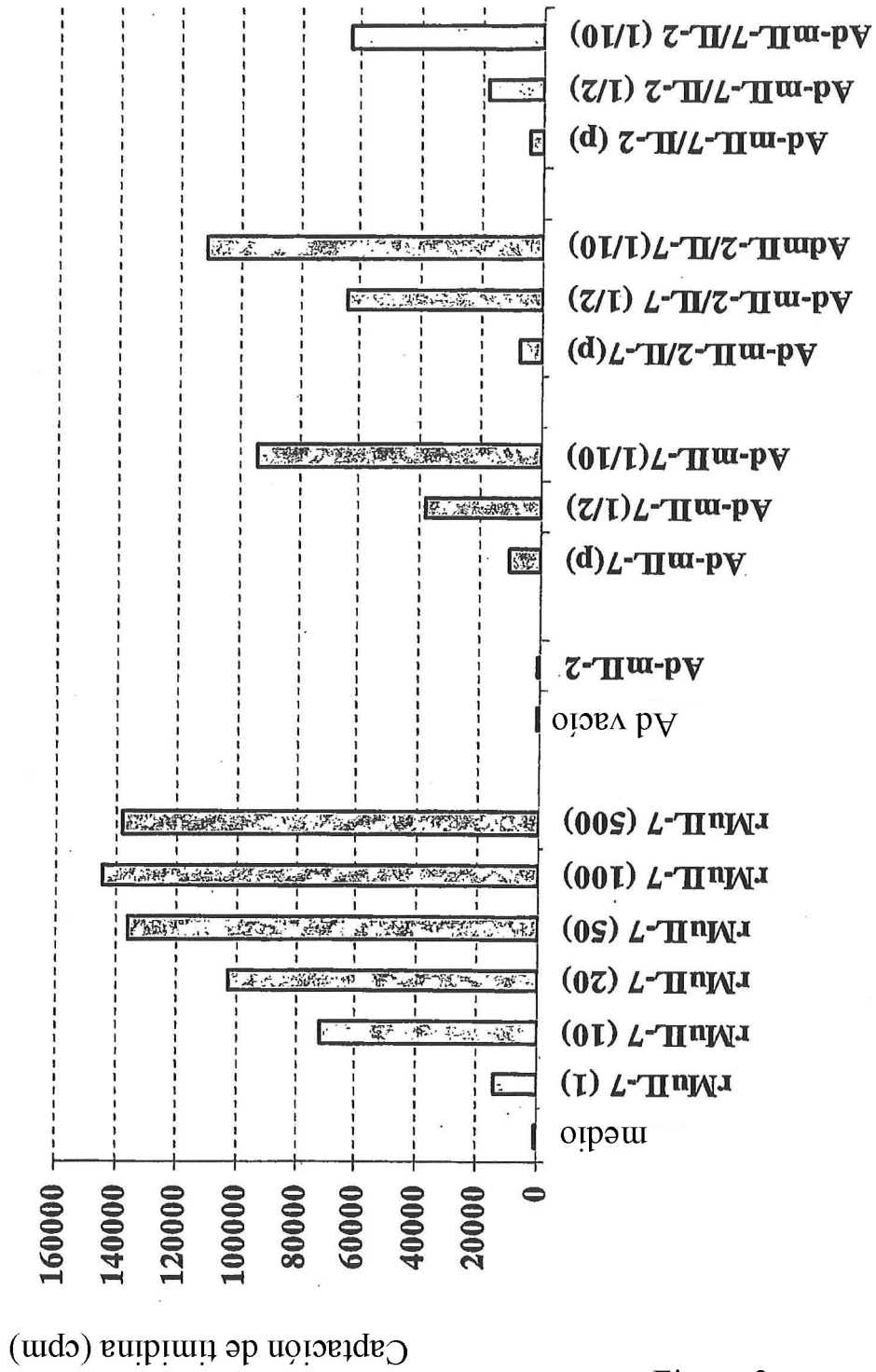


Figura 3

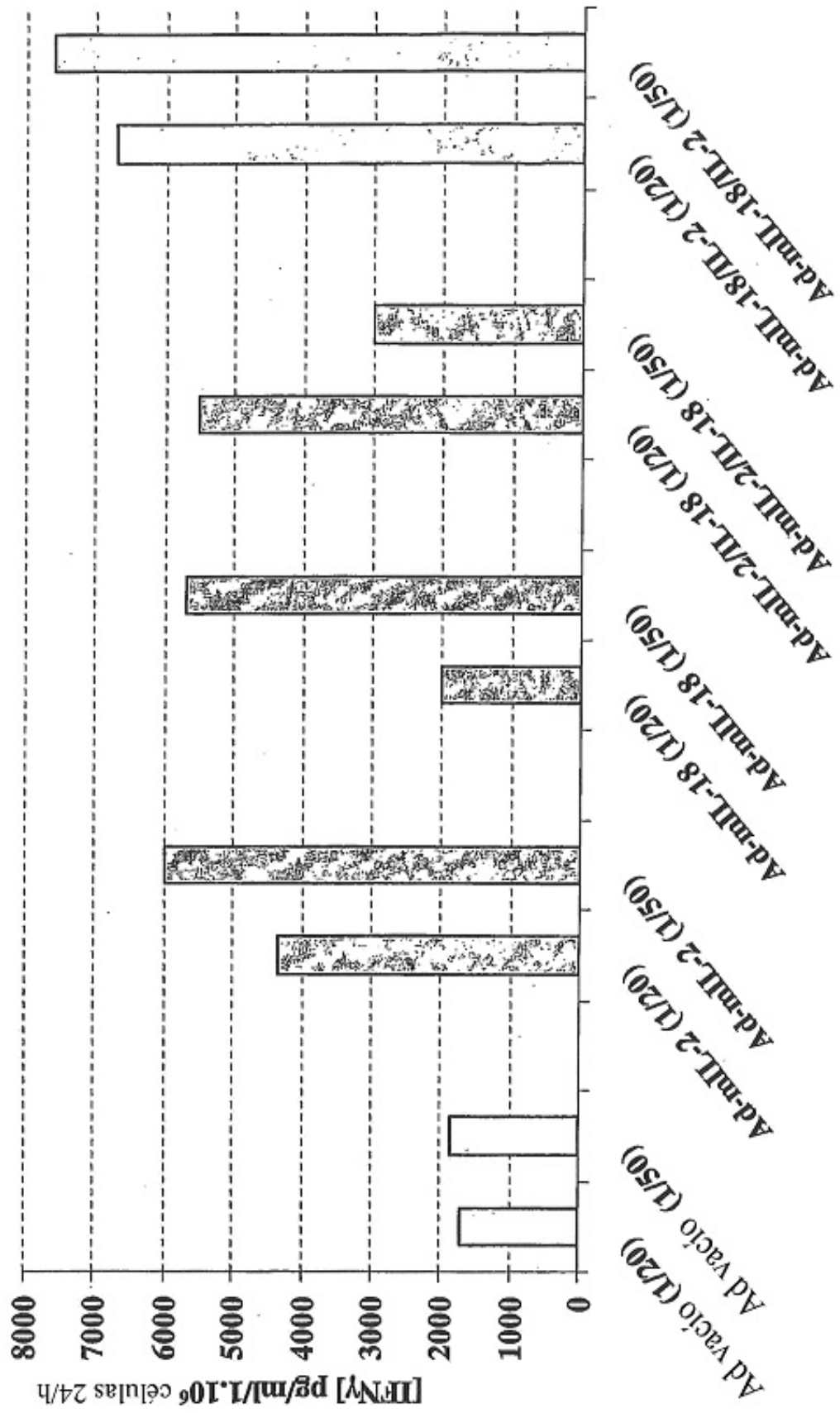


Figura 4

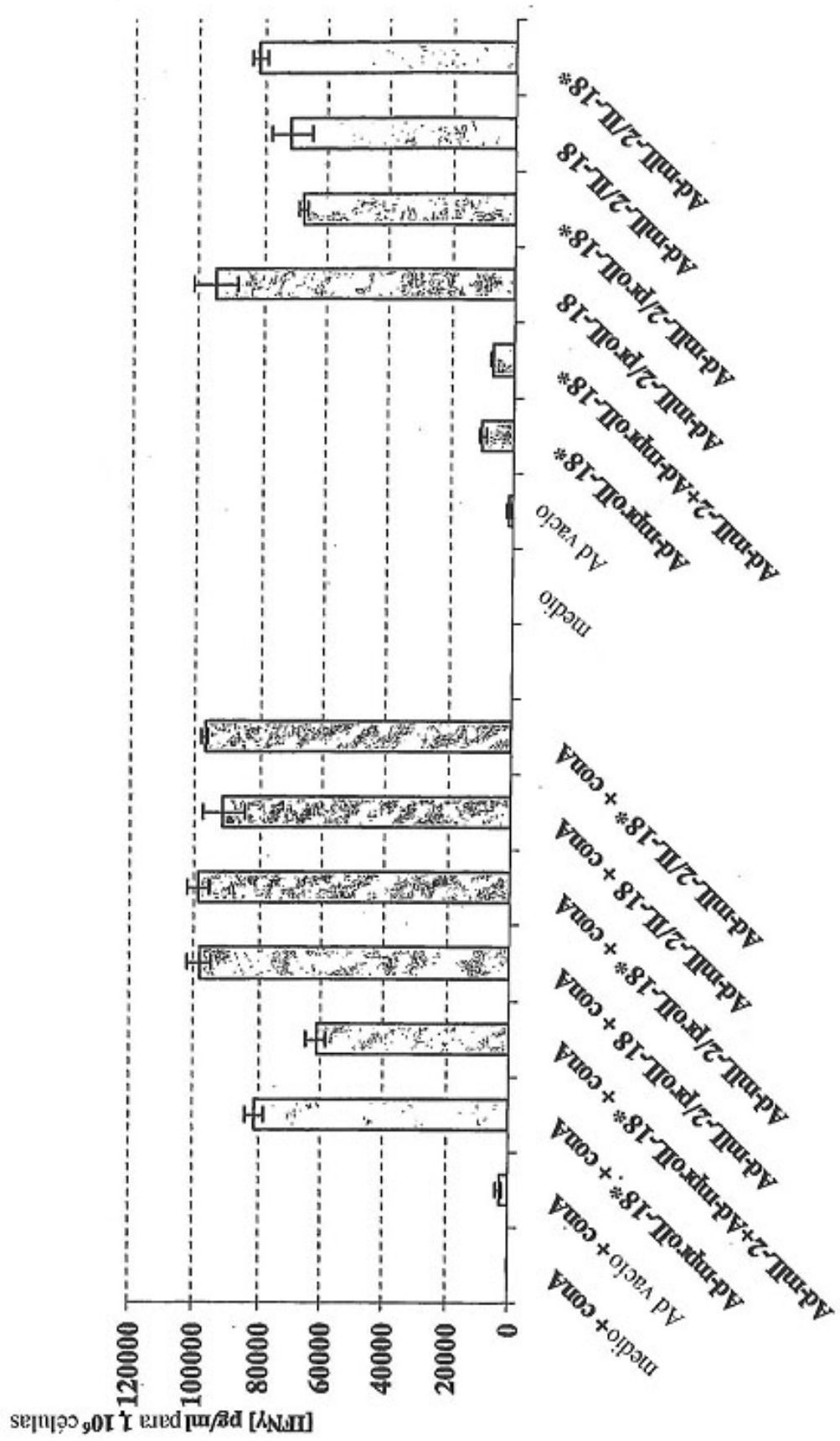


Figura 5

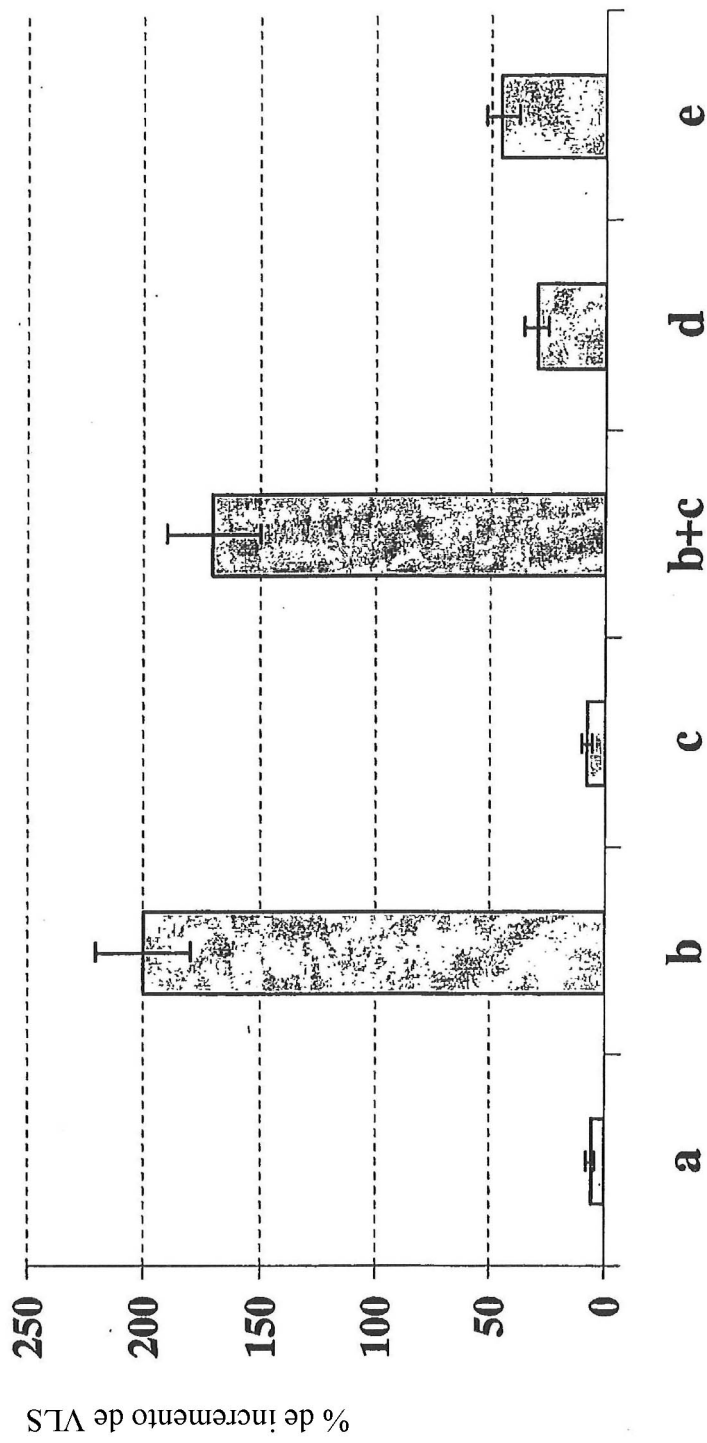


Figura 6

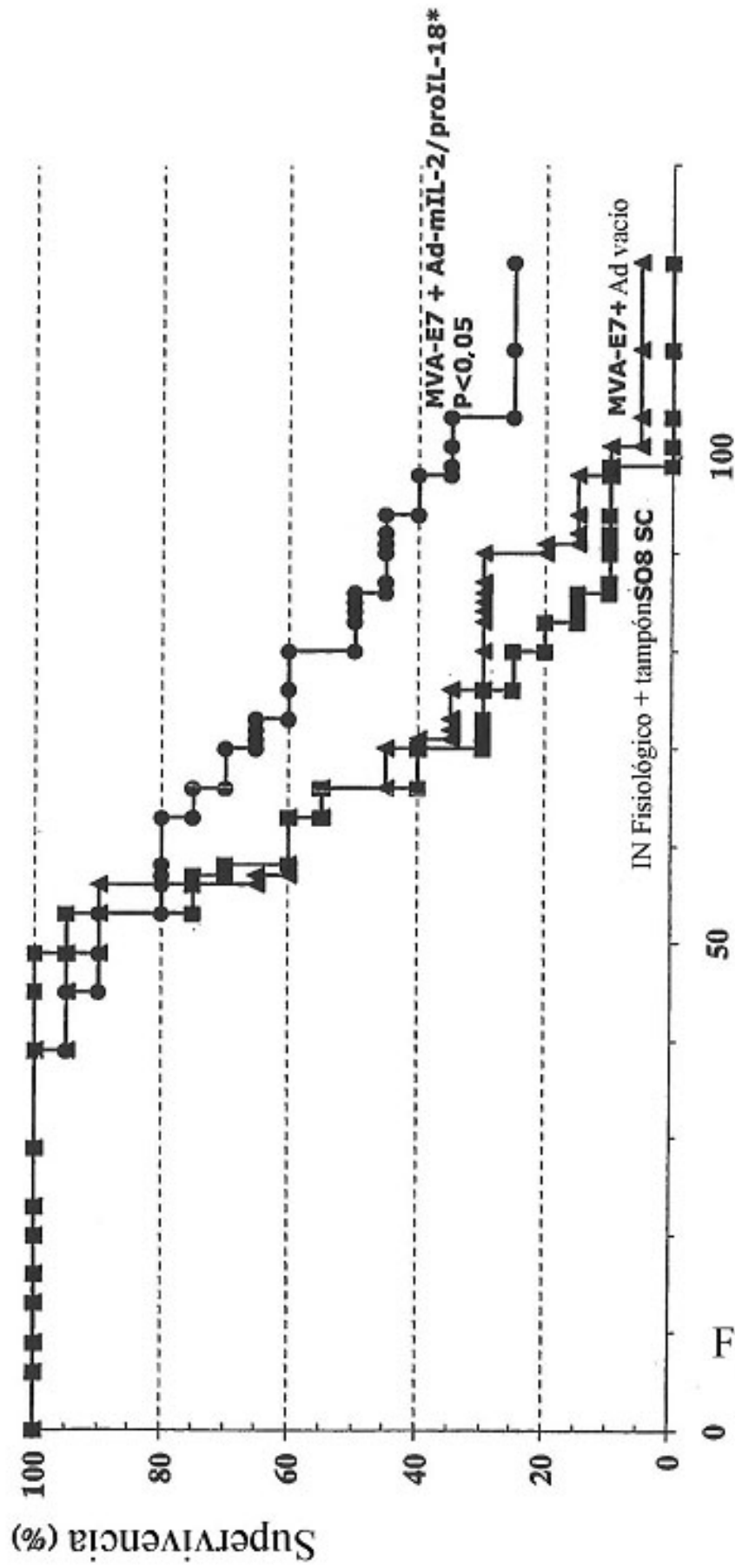
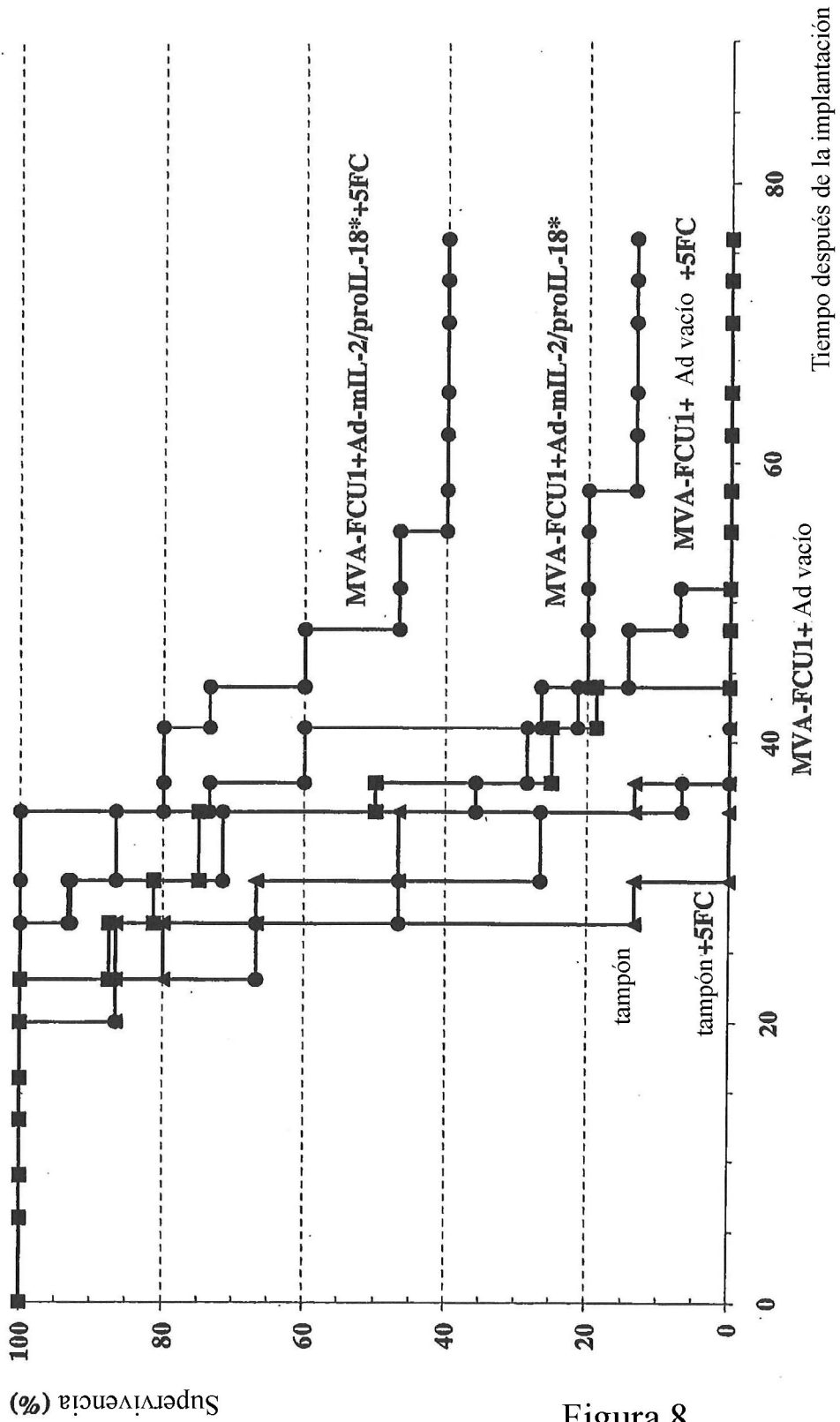


Figura 7

Tiempo después de la implantación



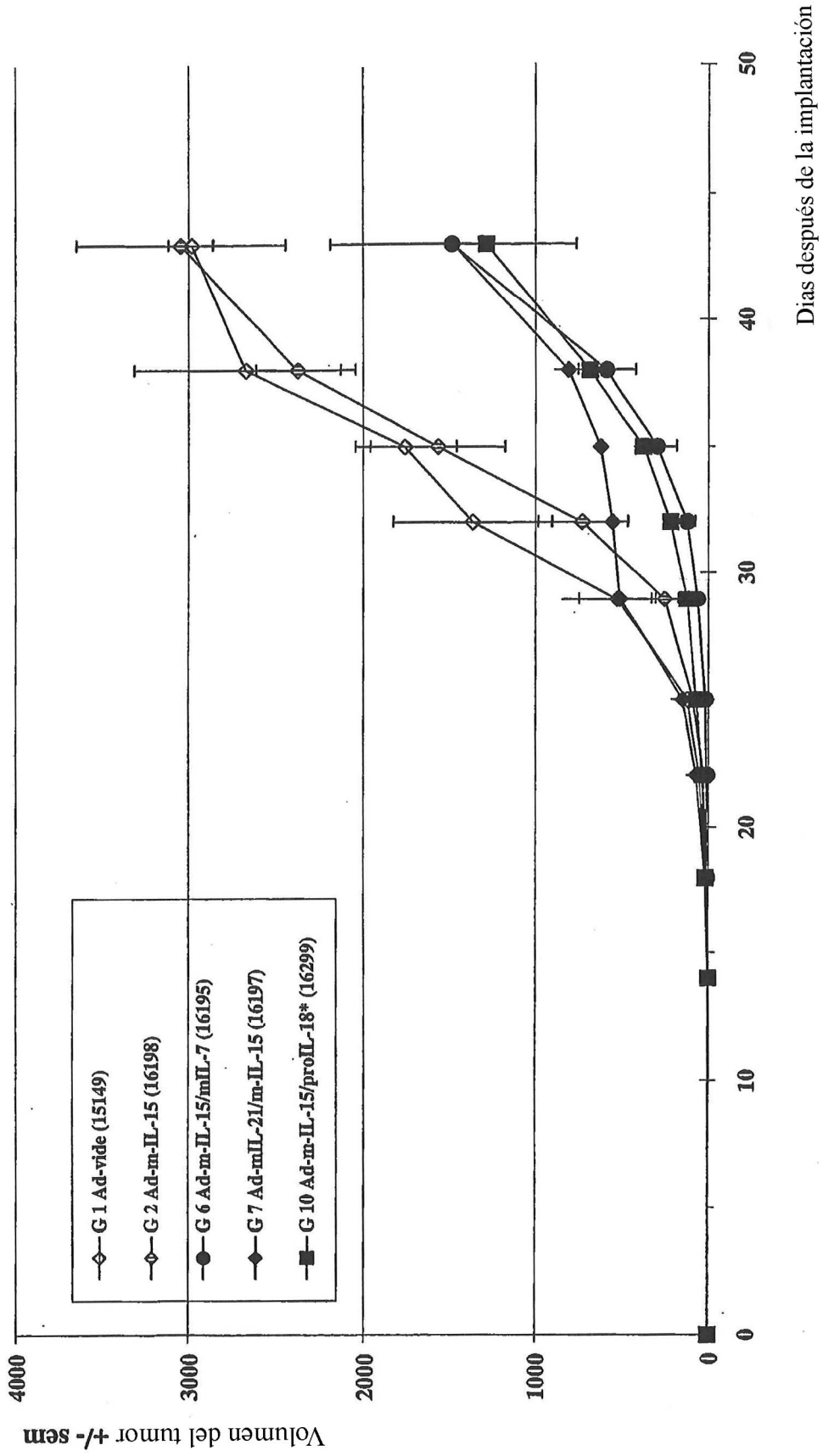


Figura 9

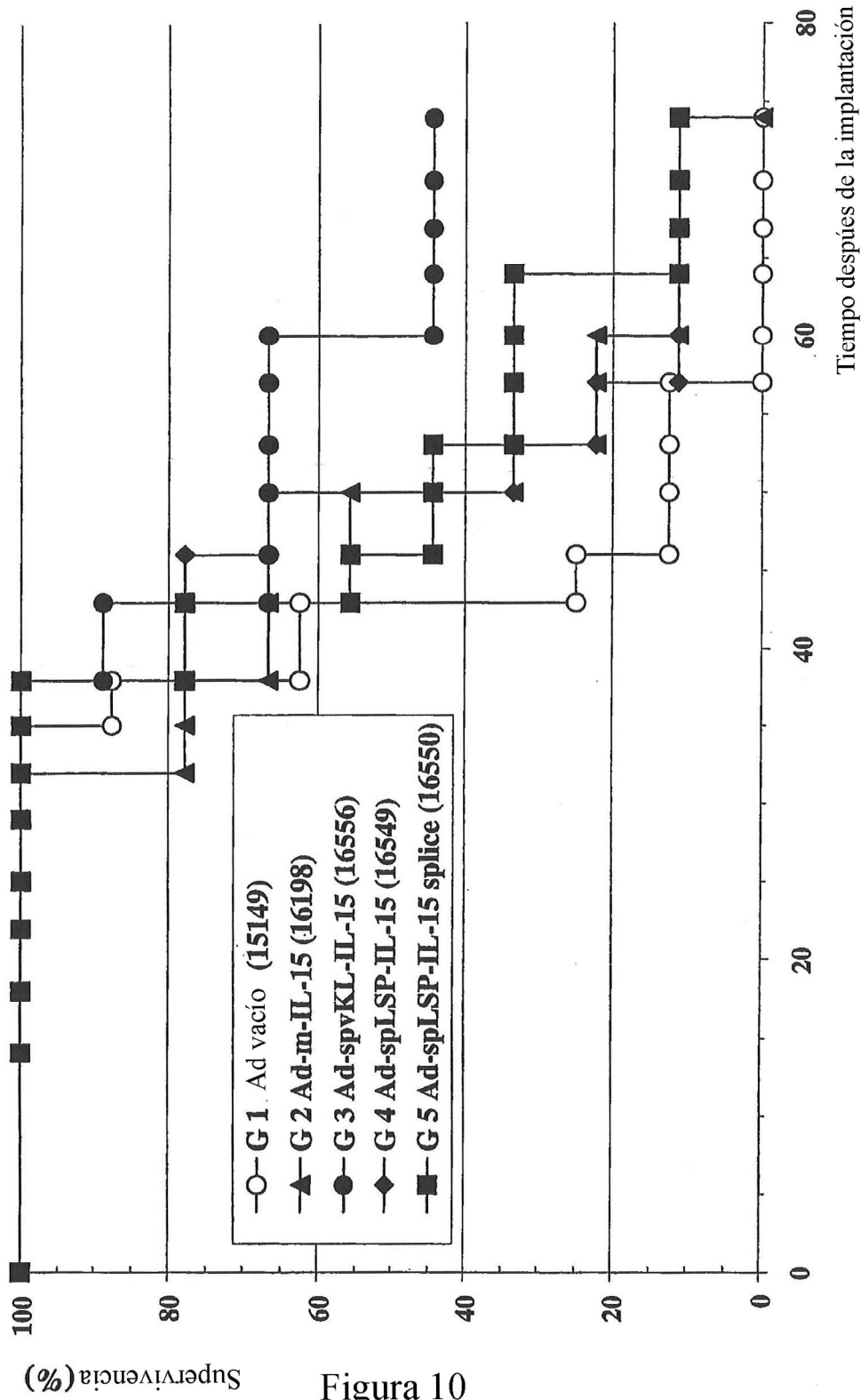


Figura 10