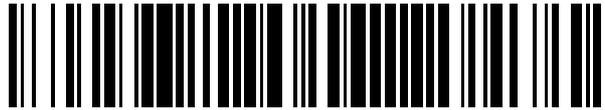


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 437**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2006 E 06818135 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 1957528**

54 Título: **Vacuna de nucleótidos**

30 Prioridad:

30.11.2005 DK 200501697

30.12.2005 DK 200501857

30.12.2005 US 755712 P

27.03.2006 DK 200600431

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.02.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF COPENHAGEN (100.0%)

POSTBOX 2177, NORREGADE 10

1017 COPENHAGEN K, DK

72 Inventor/es:

HOLST, PETER JOHANNES;

THOMSEN, ALLAN RANDRUP y

CHRISTENSEN, JAN PRAVSGAARD

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 396 437 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

Vacuna de nucleótidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una tecnología y a un método con los que se obtiene una respuesta inmunológica más rápida, más amplia y más potente al utilizar vacunas víricas y basadas en el ADN.

10 **Antecedentes de la invención**

15 A pesar de los conocimientos actuales en el campo de la inmunología, especialmente respecto a las tecnologías de vacunas, no se dispone de vacunas adecuadas contra numerosos patógenos. La pandemia generalizada del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), VLCT (virus linfotrópico de células T humanas), tuberculosis y VHC (virus de la hepatitis C) siguen fuera del alcance de la vacunación efectiva, mientras que la gripe aviaria y otros patógenos emergentes amenazan con desbordar los sistemas sanitarios. De manera similar, la explosión del terrorismo a escala mundial ha expandido las potenciales epidemias para incluir patógenos exóticos y letales tales como los virus del Ébola, de Lassa y de Marburg.

20 Las vacunas pueden ser profilácticas: se administran antes de que se produzca la infección misma, o pueden ser terapéuticas: en el caso de que induzcan o aceleren una respuesta inmunológica contra un patógeno ya presente en el cuerpo. Ambos métodos de vacunación requieren el establecimiento de una respuesta inmunológica sólida. La respuesta inmunológica que resulta activada por la infección o la vacunación depende de la interacción de varios tipos celulares, tales como las células T, B y presentadoras de antígenos, así como de varias moléculas diferentes, principalmente antígenos, moléculas del CMH, receptores de células T y B, y otras muchas.

30 Los antígenos son fragmentos peptídicos presentados sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos por moléculas del CMH. Los antígenos pueden ser exógenos, es decir, de origen patógeno, o originarse en el propio organismo, denominados antígenos propios o autoantígenos. Las moléculas del CMH son representativas de una familia de genes polimórficos codificados por una región cromosómica específica conocida como el "complejo mayor de histocompatibilidad", es decir CMH. Existen dos clases de moléculas del CMH, CMH de clase I (CMH-I) y CMH de clase II (CMH-II).

35 Las células T auxiliares resultan estimuladas por antígenos presentados por moléculas del CMH de clase II (CMH-II) que se alojan sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos. Las moléculas del CMH-II son sintetizadas en el retículo endoplasmático. Durante la síntesis, se combinan con la cadena invariante (Ii) de una manera que evita que las moléculas del CMH-II se carguen con antígenos propios o autoantígenos. La molécula de CMH-II es transportada por secuencias de señal presentes en la cadena invariante hasta la superficie celular en un compartimiento celular específico. A medida que el compartimiento madura debido al procesamiento de su contenido, progresa de ser un lisosoma, a ser un endosoma tardío (tras la fusión con vesículas endocíticas), hasta un compartimiento CMH de clase II (MIIC). La vesícula endocítica contiene xenoantígeno, es decir, fragmentos peptídicos bacterianos cortados proteolíticamente. Estos fragmentos se preparan mediante su degradación para ser cargados sobre la molécula de CMH-II. La molécula de CMH-II resulta liberada por la cadena invariante en un proceso en dos partes: en primer lugar mediante degradación proteolítica de la cadena invariante, que deja únicamente un péptido denominado CLIP en el dominio de unión a CMH-II; en segundo lugar, mediante eliminación de CLIP por la molécula HLA-DM. Stumptner *et al.*, EMBO 16:5807-5818, 1997 proporcionan una definición de la región CLIP. La molécula de CMH-II es libre a continuación de unirse a los xenoantígenos y presentarlos sobre la superficie celular tras la fusión de la vesícula del MIIC a la membrana plasmática. Se inicia así la respuesta inmunológica humoral al estimular el antígeno presentado la activación de una célula auxiliar T que a su vez activa mediante diversos medios una célula B, que finalmente se diferencia en una célula que secreta anticuerpo.

50 La respuesta inmunológica celular se inicia al reconocer el receptor de células T de las células T citotóxicas el antígeno unido a la molécula del CMH de clase I sobre una célula presentadora de antígenos. Las moléculas del CMH-I no se asocian a una molécula de una funcionalidad como la cadena invariante, que se asocia al CMH-II. El procesamiento de CMH-I en una molécula presentadora de antígenos difiere además del de las moléculas del CMH-II en que la molécula del CMH-I se encuentra cargada con antígeno ya en el retículo endoplasmático. Los antígenos presentados por la molécula de CMH-I típicamente son fragmentos peptídicos cortados por el proteasoma, de proteínas que han sido sintetizadas por la célula presentadora de antígenos misma. Estas proteínas pueden ser proteínas anormales codificadas en el propio ADN de la célula o proteínas derivadas de virus o de otros patógenos que han infectado la célula, parasitando su maquinaria de síntesis de proteínas. El sistema proteolítico relacionado con el CMH de clase I se encuentra presente en prácticamente todas las células.

65 Las funciones de los dos tipos de células T son significativamente diferentes, tal como implican sus nombres. Las células T citotóxicas erradican los patógenos intracelulares y los tumores mediante lisis directa de las células y mediante la secreción de citocinas tales como el interferón γ . La célula T citotóxica predominante es la célula T CD8⁺, que también es específica de antígeno. Las células T auxiliares también pueden lisar células, pero su función

primaria es secretar citocinas que estimulan las actividades de las células B (células productoras de antígenos) y otras células T y, de esta manera, incrementan ampliamente la respuesta inmunológica frente a xenoantígenos, incluyendo los mecanismos de respuesta mediados por anticuerpos y mediados por células T citotóxicas. Las células T CD4⁺ son el fenotipo de célula T auxiliar principal en la respuesta inmunológica.

Las vacunas tradicionales se basan en organismos completos, es decir cepas patógenas muertas o cepas de patogenicidad atenuada. Por una parte, estas vacunas comportan el riesgo de introducir la enfermedad para la prevención de la cual han sido diseñadas, en el caso de que la atenuación resulte insuficiente o suficientes organismos sobrevivan la etapa de muerte durante la preparación de la vacuna. Por otra parte, dichas vacunas presentan una infectividad reducida y con frecuencia son insuficientemente inmunogénicas, resultando en una protección inadecuada derivada de la vacunación.

Recientemente se han utilizado técnicas de biología molecular en un intento de desarrollar nuevas vacunas basadas en proteínas antigénicas individuales procedentes de los organismos patógenos. En principio, la utilización de péptidos antigénicos y no organismos completos evitaría la patogenicidad, proporcionando una vacuna que contuviese los antígenos más inmunogénicos. Sin embargo, ha demostrado ser difícil seleccionar el antígeno óptimo de una proteína o polipéptido dado y además se ha encontrado que los péptidos o carbohidratos puros tienden a ser inmunógenos débiles.

Las vacunas genéticas (de ADN) son nuevos y prometedores candidatos para el desarrollo de vacunas tanto profilácticas como terapéuticas. La potencia de la respuesta inmunológica subsiguiente está determinada por una combinación de la potencia del vector (es decir ADN desnudo, vectores víricos, virus vivos atenuados, etc.), el nivel de expresión del antígeno y el antígeno recombinante mismo (es decir, ligantes del CMH de alta o baja afinidad, determinantes estructurales que seleccionan para un repertorio más o menos limitado de células T o B, etc.). Se cree generalmente que la inducción eficiente de la memoria inmunológica requiere o se beneficia de las interacciones entre las células T CD4⁺ (células auxiliar) y las células T CD8⁺ (citotóxicas) y las células B que median en muchos de los efectos de la memoria inmunológica. Sin embargo, una potencial desventaja de las vacunas de ADN convencionales es su baja inmunogenicidad en el ser humano. Una probable causa de esta baja inmunogenicidad es el limitado acceso de los antígenos formados dentro de las células a la ruta del CMH-II para el procesamiento y la presentación de los antígenos a las células T auxiliares.

Sumario de la invención

De esta manera, la presente invención ha resuelto el problema de la estimulación de la respuesta inmunológica de una manera que incrementa la cinética de la respuesta, ampliando y mejorando simultáneamente la respuesta, y evitando simultáneamente, entre otros, las desventajas anteriormente indicadas de los métodos de vacunación descritos en el estado de la técnica. En particular, en la presente memoria se proporciona un nuevo sistema para una estimulación dirigida, específica y rápida del sistema inmunológico con el fin de mejorar la vacunación de todos los animales.

Dicho problema ha sido resuelto por las formas de realización de la presente invención caracterizadas en las reivindicaciones. Mediante la presente invención se ha encontrado que la fusión de un antígeno a la cadena invariante incrementa drásticamente las respuestas antivíricas subsiguientes de células T CD4⁺ y CD8⁺. Además, e inesperadamente, se ha encontrado que este efecto se obtiene mediante un mecanismo independiente de las células T CD4⁺. Se ha encontrado además que la protección resulta tanto acelerada como incrementada en una infección localizada aguda y letal, e incrementada en una infección sistémica con una carga elevada.

De esta manera, un objetivo de la presente invención es proporcionar un constructo de ácidos nucleicos que comprende secuencias codificantes de por lo menos una cadena invariante operativamente ligada a por lo menos una proteína o péptido antigénico o a un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido.

De manera similar, un aspecto de la presente invención es proporcionar un vector adenovírico que comprende un constructo de nucleótidos codificante de por lo menos un antígeno y por lo menos una proteína o péptido o fragmento de una proteína o péptido que estimule una respuesta inmunológica.

De esta manera, un aspecto de la presente invención proporciona un medio para estimular una respuesta inmunológica mediada por el CMH-I mediante un vector adenovírico que comprende un constructo de nucleótidos codificante de por lo menos un antígeno y por lo menos una proteína o péptido, o un fragmento de una proteína o péptido.

Otro aspecto incluye estimular una respuesta del CMH-II mediante un vector adenovírico que comprende un constructo de nucleótidos codificante de por lo menos un antígeno y por lo menos una proteína o péptido, o un fragmento de una proteína o péptido.

Un aspecto adicional proporciona unos medios para estimular la extensión intercelular del constructo de ácidos nucleicos, el vector adenovírico, las proteínas codificadas dentro de cualquiera de ellos o cualesquiera partes de cualesquiera de ellos.

5 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un vehículo de administración que comprende el constructo de ácidos nucleicos detallado en la presente memoria, especialmente un vehículo de administración tal como un vector adenovírico deficiente en replicación es relevante para la presente invención.

10 Todavía otro objetivo y un aspecto de la presente invención es proporcionar una célula que comprende el constructo de ácidos nucleicos o el vector adenovírico según la presente invención.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar una proteína quimérica codificada por el constructo de ácidos nucleicos descrito en la presente memoria o codificado por el vector adenovírico descrito en la presente memoria.

15 En un aspecto adicional de la presente invención está previsto un anticuerpo que reconoce una proteína quimérica codificada por el constructo de ácidos nucleicos o el vector adenovírico descrito en la presente memoria.

20 En un aspecto de la presente invención está prevista una vacuna que comprende el constructo de ácidos nucleicos o el vector adenovírico detallado en la presente memoria. Resulta especialmente relevante para la presente invención una vacuna en la que por lo menos una cadena invariante se encuentra operativamente ligada a por lo menos una proteína o péptido, o a un fragmento de una proteína o péptido, que estimula una respuesta del CMH-I. Lo anterior puede llevarse a cabo ligando operativamente por lo menos una cadena invariante a por lo menos una proteína o péptido antigénico, o a un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido.

25 Es un aspecto adicional de la presente invención proporcionar una vacuna que comprende la proteína quimérica codificada dentro del constructo de ácidos nucleicos o el vector adenovírico detallado en la presente memoria.

30 Es todavía otro aspecto de la presente invención proporcionar un kit de partes, comprendiendo dicho kit una composición de vacuna que comprende un vector adenovírico o un constructo de ácidos nucleicos tal como se describe en la presente memoria conjuntamente con un instrumento médico u otro medio de administración de dicha vacuna y además instrucciones sobre cómo utilizar el kit de partes.

35 Se infiere que la presente invención proporciona unos medios para inducir una respuesta inmunológica en un animal, mediante la administración en el animal de una vacuna que comprende el constructo de ácidos nucleicos o el vector adenovírico tal como se detalla posteriormente en la presente memoria.

Descripción de los dibujos

40 Figura 1: Dibujo esquemático de inserciones en el vector adenovirus.

Figura 2: Respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a epítomos codificados en adenovirus.

45 Figura 3: Respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a los epítomos codificados en adenovirus en ratones híbridos F₁.

Figura 4: Ad-liGP ejerce efectos estimuladoras de las células T CD8⁺ que son independientes de las células T CD4⁺.

50 Figura 5: Ad-liGP proporciona una protección rápida y superior contra la infección letal por VLCM.

Figura 6: Ad-liGP protege eficientemente frente a la infección por VLCM administrado a dosis alta por vía intravenosa.

55 Figura 7: Ad-liGP proporciona una protección superior frente a las variantes letales del VLCM con mutaciones en los epítomos inmunodominantes.

Figura 8: Frecuencias de células T CD8⁺ o CD4⁺ que reaccionan con epítomos específicos de VLCM tras la vacunación con Ad-liGP y el reto con variantes de VLCM con mutaciones en epítomos inmunodominantes.

60 Figura 9: Respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ frente a la vacunación con ADN-liGP y ADN-GP desnudo.

Figura 10: Vacunación profiláctica con Ad-li-GP incrementa el rechazo del tumor.

65 Figura 11: Vacunación terapéutica con Ad-li-GP incrementa la duración media de vida de los ratones portadores de tumor.

Figura 12: Tasa de supervivencia tras la vacunación con Ad-li-VSVGP o Ad-VSVGP.

Figura 13: Respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ frente a más epítomos codificados por adenovirus.

5 Figura 14: Eficiencia de los constructos de Ad-li-GP en comparación con los constructos de Ad-GP-Lamp-1 medida a partir de las respuestas de células T CD8⁺ a epítomos codificados en adenovirus.

Figura 15: Vector basado en policonectores dentro del marco.

10 Figura 16: Vectores con sitios IRE2.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

15 **Adenovirus:** un grupo de virus que contiene ADN de doble cadena. Los adenovirus pueden ser modificados genéticamente convirtiéndolos en incompetentes para la replicación o condicionalmente incompetentes para la replicación. En esta forma, en forma de constructos adenovíricos o adenovectores, pueden utilizarse como vehículos para la administración génica para la vacunación o la terapia génica.

20 **Adyuvante:** cualquier sustancia cuya mezcla con un constructo inmunogénico de determinante/antígeno/ácido nucleico incrementa o, de otro modo, modifica, la respuesta inmunológica a dicho determinante.

25 **Aminoácido:** cualquier ácido aminocarboxílico sintético o natural, incluyendo cualquier aminoácido presente en péptidos y polipéptidos, incluyendo proteínas y enzimas sintetizados *in vivo*, incluyendo de esta manera modificaciones de los aminoácidos. El término aminoácido se utiliza en la presente memoria como sinónimo de la expresión "residuo aminoácido", que pretende comprender los aminoácidos indicados que se han hecho reaccionar con por lo menos una especie diferente, tal como 2, por ejemplo 3, tal como más de 3 otras especies. El término genérico "aminoácido" comprende aminoácidos tanto naturales como no naturales, cualquiera de los cuales puede encontrarse en la forma isomérica "D" o "L".

30 **Anticuerpo:** moléculas de inmunoglobulina y partes activas de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos son, por ejemplo, moléculas de inmunoglobulina intactas o fragmentos de las mismas que conservan la actividad inmunológica.

35 **Antígeno:** cualquier sustancia que puede unirse a un receptor inmunológico clonalmente distribuido (receptor de células T o de células B). Habitualmente un péptido, un polipéptido o un polipéptido multimérico. Los antígenos preferentemente son capaces de inducir una respuesta inmunológica.

40 **Refuerzo:** el refuerzo mediante una inyección o dosis de refuerzo es proporcionar una dosis adicional de un agente inmunizador, tal como una vacuna, proporcionada un tiempo después de la dosis inicial con el fin de mantener una respuesta inmunológica inducida por la dosis anterior del mismo agente.

45 **Portador:** entidad o compuesto al que se acoplan antígenos para ayudar en la inducción de una respuesta inmunológica.

50 **Proteína quimérica:** proteína manipulada genéticamente que se encuentra codificada por una secuencia de nucleótidos construida mediante el corte y empalme de dos o más genes completos o parciales o una serie de ácidos nucleicos (no) aleatorios.

55 **Complemento:** una serie compleja de proteínas sanguíneas cuya acción "complementa" el trabajo de los anticuerpos. El complemento destruye bacterias, produce inflamación y regula las reacciones inmunológicas.

60 **Citocina:** modulador del crecimiento o de la diferenciación, término utilizado de manera no determinante en la presente memoria y que no debe limitar la interpretación de la presente invención y reivindicaciones. Además de las citocinas pueden utilizarse moléculas de adhesión o accesorias, o cualquier combinación de las mismas, solas o en combinación con las citocinas.

65 **CTL:** linfocitos T citotóxicos. Un subgrupo de células T que expresan CD8 conjuntamente con el receptor de células T y que por lo tanto son capaces de responder a los antígenos presentados por moléculas de clase I.

Vehículo de administración: una entidad en la que una secuencia de nucleótidos o polipéptido o ambos son transportados desde por lo menos un medio a otro.

Fragmento: se utiliza para indicar una parte de longitud no completa de un ácido nucleico o polipéptido. De esta manera, un fragmento por sí mismo también es un ácido nucleico o polipéptido, respectivamente.

Individuo: cualquier especie o subespecie de ave, mamífero, pez, anfibio o reptil.

5 Cadena invariante: una glucoproteína integral de membrana que se asocia a las moléculas del CMH-II en el retículo endoplasmático y posteriores compartimientos celulares, estabilizándolas. En la presente memoria el término "invariante" cubre todos los genes y proteínas homólogos, naturales o generados artificialmente, de longitud completa o fragmentados, con una determinada similitud con la cadena invariante humana. En la presente memoria "cadena invariante" se abrevia como Ii.

10 Aislado: utilizado en relación a ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos dados a conocer en la presente memoria, el término "aislado" se refiere a dichas especies identificadas y separadas y/o recuperadas a partir de un componente de su ambiente natural, típicamente celular. Los ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos de la invención preferentemente se aíslan, y las vacunas y otras composiciones de la invención preferentemente comprenden ácidos nucleicos y polipéptidos aislados o anticuerpos aislados.

15 MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, existen dos subclases principales de MHC, la clase I y la clase II.

20 Ácido nucleico: una cadena o secuencia de nucleótidos portadora de información genética. En el contexto de la presente invención el ácido nucleico es un ácido desoxirribonucleico (ADN).

25 Constructo de ácidos nucleicos: un ácido nucleico genéticamente manipulado. Típicamente comprende varios elementos, tales como genes o fragmentos de los mismos, promotores, intensificadores, terminadores, colas poliA, conectores, policonectores, conectores operativos, sitios de clonación múltiples (SCM), codones de parada, otros elementos reguladores, sitios internos de entrada ribosómica (IRES) u otros.

30 Conector operativo: una secuencia de nucleótidos o residuos aminoácidos que une entre sí dos partes de un constructo de ácidos nucleicos o polipéptido (quimérico) de manera que se asegura el procesamiento biológico del ácido nucleico o polipéptido.

35 Patógeno: un agente causante específico de una enfermedad, especialmente un agente biológico tal como un virus, bacteria, prión o parásito que puede provocar una enfermedad en su huésped, también denominado agente infeccioso.

40 Péptido: pluralidad de residuos aminoácidos unidos covalentemente que define una secuencia y que se encuentran unidos mediante enlaces amida. El término se utiliza análogamente a oligopéptido y polipéptido. Los aminoácidos naturales y/o no naturales pueden unirse mediante enlaces peptídicos o mediante enlaces no peptídicos. El término péptido también comprende modificaciones postraduccionales introducidas mediante reacciones químicas o catalizadas enzimáticamente, tal como son conocidas de la técnica. El término puede referirse a una variante o fragmento de un polipéptido.

45 Portadores farmacéuticos: también denominados excipientes, o estabilizadores, no resultan tóxicos para la célula o individuo expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones utilizadas. Con frecuencia, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones tales como el fosfato, el citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo la glucosa, la manosa o las dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; alcoholes de sacárido tales como el manitol o el sorbitol; contraiones formadores de sales tales como el sodio y/o surfactantes no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

Pluralidad: por lo menos dos.

55 Promotor: un sitio de unión en una cadena de ADN en el que se une la ARN polimerasa, iniciando la transcripción de ARN mensajero de uno o más genes estructurales próximos.

Péptido de señal: una secuencia corta de aminoácidos que determina la localización final de una proteína en la célula, también denominado péptido de clasificación.

60 ARNip: ARN interfirientes pequeños (ARNip), con diana (de manera específica de diana) en ARN endógenos para la degradación, reduciendo de esta manera la cantidad de producto génico.

65 Surfactante: un agente activo en superficie capaz de reducir la tensión superficial de un líquido en el que se encuentra disuelto. Un surfactante es un compuesto que contiene un grupo polar que es hidrófilo y un grupo no polar que es hidrófobo y con frecuencia compuesto de una cadena grasa.

Vacuna: una sustancia o composición capaz de inducir una respuesta inmunológica en un animal. También se denomina composición inmunogénica en la presente memoria. Una respuesta inmunológica es una respuesta inmunológica (humoral/de anticuerpos y/o celular) que induce memoria en un organismo, resultando en que el agente infeccioso es combatido por una respuesta secundaria, no primaria, reduciendo de esta manera su impacto sobre el organismo huésped. Una vacuna de la presente invención puede administrarse a modo de medicamento profiláctico y/o terapéutico. La composición puede comprender uno o más de los siguientes: uno o más antígenos, constructos de ácidos nucleicos que comprenden uno o más antígenos operativamente ligados a li, portadores, adyuvantes y portadores farmacéuticos.

Variante: una "variante" de un ácido nucleico o polipéptido de referencia se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que expresa un grado determinado de homología/identidad de secuencia con dicho ácido nucleico o polipéptido de referencia pero que no es idéntico a dicho ácido nucleico o polipéptido de referencia.

La presente invención se refiere a una vacuna que comprende un constructo de ácidos nucleicos, tal como un constructo de ADN, especialmente un constructo de ácidos nucleicos que comprende secuencias codificantes de una cadena invariante operativamente ligada a secuencias codificantes de proteína o péptido antigénico. La vacuna estimula una respuesta inmunológica, especialmente una respuesta inmunológica de una manera dependiente del CMH-I, aunque independiente de las células T CD4⁺.

Constructo de ácidos nucleicos

Un aspecto de la presente invención se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden secuencias codificantes de por lo menos una cadena invariante operativamente ligada a por lo menos una proteína o péptido antigénico o a un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido; en resumen, un antígeno.

Se entiende que constructo de ácidos nucleicos es un ácido nucleico genéticamente manipulado. El constructo de ácidos nucleicos puede ser un ácido nucleico no replicante y lineal, un vector de expresión circular, un plásmido de replicación autónoma o un vector de expresión vírico. Un constructo de ácidos nucleicos puede comprender varios elementos tales como, aunque sin limitación, genes o fragmentos de los mismos, promotores, intensificadores, terminadores, colas poli-A, conectores, policonectores, conectores operativos, sitios de clonación múltiple (MCS), marcadores, codones de parada, sitios internos de entrada ribosómica (IRES) y secuencias homólogas del huésped para la integración, u otros elementos definidos. Los métodos para manipular los constructos de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, editores, Cold Spring Harbor Laboratory, 2a edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Se proporcionan ejemplos de partes de constructos de ácidos nucleicos en las figuras 1, 15 y 16, así como en las secuencias identificadas como SEC ID n° 5, n° 6, n° 7, n° 8, n° 9 y n° 10. Las secuencias parciales del vector de SEC ID n° 5, n° 6, n° 7, n° 8, n° 9 y n° 10 se han generado mediante subclonación de diversos elementos tal como se ha indicado anteriormente y tal como se ilustra en las figuras 1, 15 y 16. Todas estas secuencias parciales se insertan en el vector pAC-CMVpLpARS(+) (Becker *et al.*, *Methods Cell Biol.* 43 parte A:161-189, 1994); ver GenBank n° de acceso AY590429.1.

Cadena invariante

La cadena invariante (li) o CD74 es una proteína integral de membrana de tipo II no polimórfica, ver las SEC ID n° 2 y n° 4 para las secuencias de aminoácidos de la li humana y de ratón, respectivamente, y de manera similar las SEC ID n° 1 y n° 3 para las secuencias de ácidos nucleicos de la li humana y de ratón, respectivamente. La cadena invariante presenta múltiples funciones en la maduración de los linfocitos y en las respuestas inmunológicas adaptativas, en particular en el reconocimiento de compartimientos lisosómicos en los que la secuencia CLIP de li puede ocupar las moléculas del CMH de clase II hasta que éstas se fusionan con los compartimientos endosómicos (Pieters J., *Curr. Opin. Immunol.* 9:8996, 1997). Además, se ha demostrado que li funciona como una chaperona del CMH de clase I (Morris *et al.*, *Immunol. Res.* 30:171-179, 2004) y debido a su secuencia de localización endosómica, que facilita la estimulación de las células T CD4⁺, aunque no las CD8⁺, dirigidas contra antígenos unidos covalentemente (Diebold *et al.*, *Gene Ther.* 8:487-493, 2001).

La proteína de cadena invariante comprende varios dominios: un dominio citosólico que incluye un péptido señal o clasificación (también conocido como secuencia de localización lisosómica), un dominio transmembranal y un dominio luminal que comprende en sí mismo una región CLIP, una región KEY, un dominio nuclear y un dominio de trimerización. Estos dos dominios se encuentran flanqueados por regiones altamente flexibles (Strumptner-Cuvelette y Benaroch, *Biochem. Biophys. Acta* 1542:1-13, 2002). La cadena invariante ha sido caracterizada en varios organismos, incluyendo vertebrados (por ejemplo el pollo), mamíferos (por ejemplo la vaca, el perro, el ratón y la rata) y seres humanos.

La presente invención se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden secuencias en las que por lo menos una cadena invariante es específica de organismo o puede relacionarse con un organismo específico. Preferentemente por lo menos una cadena invariante es de origen vertebrado, más preferentemente de origen

5 mamífero y todavía más preferentemente de origen humano. En relación a lo anterior, la secuencia definida por SEC ID nº 1 es la secuencia de ácidos nucleicos de la cadena invariante de origen humano. La cadena invariante utilizada preferentemente es la cadena invariante del organismo destinado a recibir la vacunación. Es un objetivo de la presente invención que la cadena invariante y los organismos huésped o receptores del tratamiento sean de la misma especie.

10 La presente invención se refiere además a un constructo de ácidos nucleicos en el que la cadena o cadenas invariantes codificadas son un fragmento de la secuencia identificada en SEC ID nº 2, de por lo menos 40 aminoácidos de identidad de por lo menos 85% respecto al mismo fragmento de SEC ID nº 2.

15 El fragmento presenta por lo menos 40 aminoácidos de cualquier parte de la cadena invariante indicada en SEC ID nº 2. Lo anterior incluye un fragmento que incluye los residuos 1 a 40, 10 a 50, 20 a 60, 25 a 65, 30 a 70, 35 a 75, 40 a 80, 45 a 85, 50 a 90, 55 a 95, 60 a 100, 65 a 105, 70 a 110, 75 a 115, 80 a 120, 85 a 125, 90 a 130, 95 a 135, 100 a 140, 105 a 145, 110 a 150, 115 a 155, 120 a 160, 125 a 165, 130 a 170, 135 a 175, 140 a 180, 145 a 185, 150 a 190, 155 a 195, 160 a 200, 165 a 205, 170 a 210 y 175 a 216. También incluye fragmentos tales como cualesquiera de los mencionados anteriormente, expandidos hasta 5 residuos a ambos lados de los mismos. Incluye además un fragmento de por lo menos 50 residuos, de por lo menos 60 residuos, de por lo menos 70 residuos, de por lo menos 80 residuos, de por lo menos 90 residuos, de por lo menos 100 residuos, de por lo menos 110 residuos, de por lo menos 120 residuos, de por lo menos 130 residuos, de por lo menos 140 residuos, de por lo menos 150 residuos, de por lo menos 160 residuos, de por lo menos 170 residuos, de por lo menos 180 residuos, de por lo menos 190 residuos, de por lo menos 200 residuos y de por lo menos 210 residuos.

25 Cualesquiera de los fragmentos anteriormente indicados que presente una identidad de secuencia de por lo menos 85%, por ejemplo de por lo menos 90%, por ejemplo de por lo menos 91%, por ejemplo de por lo menos 92%, por ejemplo de por lo menos 93%, por ejemplo de por lo menos 94%, por ejemplo de por lo menos 95%, por ejemplo de por lo menos 96%, por ejemplo de por lo menos 97%, por ejemplo de por lo menos 98%, por ejemplo de por lo menos 99% respecto a la SEC ID nº 2, se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

30 La identidad/homología entre secuencias de aminoácidos puede calcularse utilizando matrices de puntuación bien conocidas, tales como cualquiera de entre BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85 y BLOSUM 90.

35 Preferentemente, la presente invención es un constructo de ácidos nucleicos en el que la cadena o cadenas invariantes codificadas son un fragmento de SEC ID nº 2 de por lo menos 186 aminoácidos. Lo anterior incluye cualquiera de los fragmentos definidos anteriormente, y que de esta manera comparte identidad con la secuencia de la cadena invariante de SEC ID nº 2.

40 La presente invención se refiere además a un constructo de ácidos nucleicos en el que la cadena o cadenas invariantes codificadas presenta una identidad de por lo menos 85% respecto a SEC ID nº 2.

45 Lo anterior comprende que cualquier secuencia derivada de la cadena invariante, indicada en la SEC ID nº 2, que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 85%, por ejemplo de por lo menos 90%, por ejemplo de por lo menos 91%, por ejemplo de por lo menos 92%, por ejemplo de por lo menos 93%, por ejemplo de por lo menos 94%, por ejemplo de por lo menos 95%, por ejemplo de por lo menos 96%, por ejemplo de por lo menos 97%, por ejemplo de por lo menos 98%, por ejemplo de por lo menos 99% respecto a SEC ID nº 2 se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención. Lo anterior incluye secuencias que son más largas o más cortas que la secuencia indicada en SEC ID nº 2.

50 Más preferentemente, la presente invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos en el que la cadena o cadenas invariantes codificadas son idénticas a SEC ID nº 2.

Cualquiera de las secuencias anteriormente indicadas, con independencia del origen, identidad de secuencia o longitud proceden de las denominadas en la presente memoria variantes de la cadena invariante.

55 Se infiere que, dentro del alcance de la presente invención, una variante de la cadena invariante de cualquier organismo puede ser una variante según lo anteriormente indicado, es decir, que la variante puede ser un fragmento de la cadena invariante de un organismo y/o puede ser por lo menos 85% idéntica a dicha cadena invariante a lo largo de toda la secuencia de la cadena invariante o dentro del fragmento de la misma. La cadena invariante también puede ser una especie u organismo relacionado, o ser de una especie lejanamente emparentada.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la adición, eliminación o sustitución de regiones, péptidos o dominios de por lo menos una cadena invariante codificada por el constructo de ácidos nucleicos. La eliminación de una o más de dichas regiones, péptidos o dominios truncará la cadena invariante resultante. La adición o sustitución de una región, péptido o dominio incluye la opción de seleccionar estas secuencias de fuentes conocidas tales como proteínas o polipéptidos naturales, o polipéptidos sintetizados artificialmente o ácidos nucleicos codificantes de los mismos. La adición de regiones, dominios o péptidos incluye la opción de añadir uno, dos o más de cada tipo o de

diferentes tipos de regiones, dominios o péptidos, y uno, dos, tres o más de los ácidos nucleicos codificantes de dichas regiones, dominios y péptidos. Estos pueden ser idénticos o diferir entre sí en sus secuencias. Las regiones, péptidos y dominios no proceden necesariamente del mismo organismo que el de la cadena invariante de andamiaje. Es bien conocida en la técnica la realización de adiciones, deleciones y sustituciones de nucleótidos individuales, así como de tramos de nucleótidos, que codificarán el polipéptido resultante.

La alineación de secuencias de ácidos nucleicos y especialmente de proteínas de genes o proteínas homólogos procedentes de diferentes organismos puede ser de gran ayuda durante la determinación de qué sustituciones, deleciones, reorganizaciones u otras alteraciones resultaría beneficioso construir. La alineación de secuencias de cadena invariante humana y variante tales como las ilustradas posteriormente, proporciona una indicación de qué residuos aminoácidos pueden resultar importantes para la estructura y función de la cadena invariante estos organismos; estos son los residuos que se encuentran conservados en las dos secuencias. De manera similar, los residuos presumiblemente menos importantes son aquellos en los que difieren las secuencias. Resulta interesante en la presente invención llevar a cabo sustituciones y/o deleciones de los residuos/regiones variantes. Al intentar mutar o deleccionar, o alterar de otro modo, la secuencia de, por ejemplo, la cadena invariante humana con el fin de mejorar su capacidad estimuladora de la respuesta inmunológica, también puede ser relevante el examen de los residuos conservados y la realización de, por ejemplo, sustituciones homólogas (es decir, sustituciones en las que los aminoácidos se consideran de, por ejemplo, la misma calidad estructural, polaridad, hidrofobicidad u otro).

humana	1	MDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILVTL LLAGQATTAYFLYQQQG
murina	1	MDDQRDLISNHEQLPILGNRPREPE-RCSRGALYTGVSVLVALLLAGQATTAYFLYQQQG
humana	61	RLDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPMGALPQGPMQNATKYGN
murina	60	RLDKLTITSQNLQLES LRMKLPKSAKPVSQMRMATPLLMRPMMDNMLLGPVKNVTKYGN
humana	121	MTEDHVMHLLQNADPLKVYPPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRH
murina	120	MTQDHVMHLLTRSGPLE-YPQLKGTFFENLKHLKNSMDGVNWKI FESWMKQWLLFEMSKN
humana	181	SLEQK-PTDAPPKESLELEDPS SGLGVTKQDLGPVPM
murina	179	SLEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQELGQVTL

Una forma de realización preferida de la presente invención se refiere a por lo menos una cadena invariante en la que se ha eliminado, sustituido o añadido el péptido señal a la secuencia codificante de la cadena invariante. Un péptido señal es una secuencia corta de aminoácidos que determina la localización final de una proteína en la célula, también denominado péptido de clasificación. Los péptidos señal que determinan la localización de las proteínas en compartimientos subcelulares tales como el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y los diversos compartimientos que comprenden el aparato de Golgi, el núcleo, la membrana plasmática, la mitocondria y los diversos espacios y membranas en los mismos, peroxisomas, lisosomas, endosomas y vesículas secretorias, entre otros, se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Una forma de realización preferida comprende únicamente la secuencia de localización lisosómica de la cadena invariante. Otra forma de realización preferida comprende únicamente la región KEY de la cadena invariante.

Otra forma de realización preferida de la presente invención se refiere a la eliminación, adición o sustitución de la región CLIP de por lo menos una cadena invariante. Tal como se ha indicado anteriormente, la adición o la sustitución de la región CLIP incluye las opciones de añadir o sustituir la región CLIP existente en la variante de la cadena o cadenas invariantes seleccionadas, por regiones CLIP de cadenas variantes de los mismos u otros organismos o de variantes de regiones CLIP de los mismos o de otros organismos. Las regiones CLIP de la variante pueden ser, según se infiere de lo anteriormente indicado, versiones mutantes de la región CLIP generadas específicamente, generadas mediante sustituciones, deleciones o adiciones individuales o múltiples de ácidos nucleicos. Una forma de realización preferida comprende la región CLIP únicamente, o la región CLIP conjuntamente con la secuencia contigua N-terminalmente o la secuencia contigua C-terminalmente sin cualesquiera otras regiones o dominios de la cadena invariante. Otras formas de realización preferidas comprenden solas las secuencias contiguas N-terminalmente o C-terminalmente a la región CLIP aunque sin la región CLIP misma. El término "contiguo" se refiere a cualesquiera aminoácidos a menos de 10 residuos de la región CLIP, a menos de 20 residuos, a menos de 30 residuos, a menos de 40 residuos, a menos de 50 residuos, a menos de 75 residuos o a menos de 100 residuos de la región CLIP.

Una forma de realización de la presente invención se refiere a fragmentos de cadena invariante tal como se ha indicado anteriormente sin la región CLIP. Estos fragmentos pueden presentar una longitud de por lo menos 5 residuos aminoácidos, de por lo menos 10 residuos, de por lo menos 15 residuos, de por lo menos 20 residuos, de por lo menos 25 residuos, de por lo menos 30 residuos o de por lo menos 35 residuos. Otra forma de realización se refiere a fragmentos de cadena invariante en los que se ha eliminado el péptido señal y el fragmento de cadena invariante presenta una longitud de por lo menos 10 residuos aminoácidos, de por lo menos 15 residuos, de por lo menos 20 residuos, de por lo menos 25 residuos, de por lo menos 30 residuos, de por lo menos 35 residuos, de por lo menos 50 residuos, de por lo menos 60 residuos, de por lo menos 70 residuos, de por lo menos 80 residuos, de por lo menos 90 residuos, de por lo menos 100 residuos, de por lo menos 110 residuos, de por lo menos 120

residuos, de por lo menos 130 residuos, de por lo menos 140 residuos, de por lo menos 150 residuos, de por lo menos 160 residuos, de por lo menos 170 residuos, o de por lo menos 180 residuos.

Antígeno

5 Cualquiera de las variantes anteriormente indicadas de cadena invariante se encuentra comprendida en la presente invención en la forma en que por lo menos una de dichas variantes se encuentra operativamente unida a por lo menos un antígeno, tal como una proteína o péptido antigénico o un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido.

10 Es un objetivo de la presente invención incluir, aunque sin limitación, proteínas o péptidos antigénicos o fragmentos de dichas proteínas o péptidos originados de organismos patógenos, polipéptidos y antígenos específicos de cáncer, y proteínas o péptidos asociados a una respuesta fisiológica anormal.

15 Más preferentemente, es un objetivo de la presente invención incluir un antígeno originado de cualquiera de los tipos siguientes de patógeno: virus, microorganismos y parásitos. Lo anterior incluye patógenos de cualquier animal conocido. Resulta preferible disponer de un antígeno procedente de un patógeno de mamífero, es decir, un patógeno con diana específicamente en animales mamíferos. Resulta más preferente disponer de un antígeno procedente de un patógeno humano. En general puede utilizarse cualquier antígeno que se encuentre que esté asociado a un patógeno humano.

20 En una forma de realización preferida por lo menos un antígeno puede originarse, aunque sin limitación, de cualquiera de las familias de virus siguientes: adenovirus, Arenaviridae, Astroviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Herpesviridae, Ortomixoviridae, Paramixoviridae, Picornaviridae, Poxviridae, Reoviridae, Retroviridae, Rabdoviridae y Togaviridae.

25 Más específicamente, por lo menos un antígeno o secuencia antigénica puede derivarse de cualquiera de los virus siguientes: influenza A, tal como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, rotavirus, cualquier virus del grupo del virus Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de la fiebre Dengue, viruela del mono, los Mononegavirales, lissavirus tales como el virus de la rabia, virus del murciélago de Lagos, virus Mokola, virus Duvenhage, virus del murciélago europeo 1 y 2 y virus del murciélago australiano, efemerovirus, vesiculovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), herpesvirus tales como los virus Herpes simplex de tipos 1 y 2, varicela zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr (EBV), herpesvirus humanos (HHV), herpesvirus humanos de tipos 6 y 8, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma, herpesvirus-y murino, arenavirus tales como el virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, virus de la fiebre hemorrágica asociado a Sabiá, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la fiebre de Lassa, virus Machupo, virus de la coriomeningitis linfocítica (VLCM), Bunyaviridae tales como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, hantavirus, fiebre hemorrágica con virus causante de síndrome renal, virus de la fiebre del valle del Rift, Filoviridae (filovirus), incluyendo la fiebre hemorrágica Ébola y fiebre hemorrágica Marburg, Flaviviridae, incluyendo el virus de la enfermedad del bosque de Kyasanur, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, virus causante de la encefalitis transmitida por garrapatas y Paramyxoviridae tales como el virus Hendra y el virus Nipha, Variola major y Variola minor (viruela), alfavirus tales como el virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina del este, virus de la encefalitis equina del oeste, coronavirus asociado a SARS (SARS-CoV), virus del Nilo Occidental y cualquier virus causante de encefalitis.

30 En una forma de realización preferida de la invención por lo menos una proteína o péptido antigénico procede de un virus seleccionado de entre el grupo de: VIH, virus de la hepatitis C, virus de la gripe, virus herpes, virus de Lassa, virus del Ébola, virus de la viruela, virus de la gripe aviaria, filovirus, virus de Marburg y virus del papiloma.

35 En una forma de realización más preferente de la invención, una o más proteínas o péptidos antigénicos se seleccionan y/o pueden ser por lo menos un fragmento antigénico de cualquiera de entre el grupo siguiente: glucoproteínas del virus de la estomatitis vesicular (VSV-GP), NS-1 del virus de la gripe A (proteína no estructural 1), M1 del virus de la gripe A (proteína matricial 1), NP del virus de la gripe A (nucleoproteína), NP del VLCM, GP del VLCM, GP del virus del Ébola, NP del virus del Ébola, M2 de herpesvirus-y murino, M3 y ORF73 (tal como M2 del virus MHV-68, M3 y ORF73), ovoalbúmina (OVA) de pollo o un epítipo de células T auxiliares. Se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención combinar dos o más de cualesquiera de los antígenos mencionados anteriormente en la presente memoria.

40 Una forma de realización de la presente invención incluye por lo menos una proteína o péptido antigénico o un fragmento de una proteína o péptido antigénico procedente de un microorganismo. Más específicamente, por lo menos un antígeno puede derivarse de uno de entre el listado no limitativo siguiente: ántrax (*Bacillus anthracis*), *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* (*Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. dublin*, *S. typhimurium*), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter* tales como *Campylobacter jejuni*, *Cytococcus neoformans*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Leptospira*, *Legionella*

5 *pneumophila*, *Borrelia burgdorferi*, especies de *Streptococcus* tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Vibrio* tales como *Vibrio cholerae* O1, *V. cholerae* no O1, *V. parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. carchariae*, *V. hollisae*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii*, *V. damsela*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas veronii*, *Plesiomonas shigelloides*, especies de *Shigella* tales como *Shigella sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri* y *S. dysenteriae*, *Escherichia coli* EEC enterovirulento (*Escherichia coli* - enterotoxigénico (ETEC), *Escherichia coli* - enteropatógeno (EPEC), *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágico (EHEC), *Escherichia coli* - enteroinvasivo (EIEC)), especies de *Staphylococcus* tales como *S. aureus* y especialmente las especies de resistencia intermedia/resistentes a la vancomicina (VISA/VRSA) o las especies resistentes a múltiples fármacos (MRSA), especies de *Shigella* tales como *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *Cryptosporidium parvum*, especies de *Brucella* tales como *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. canis*, *Burkholderia mallei* y *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia prowazekii*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*.

15 En una forma de realización preferida de la invención, una o más proteínas o péptidos antigénicos proceden de un microorganismo seleccionado de entre el grupo de *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, especies de *Staphylococcus* y especies de *Vibrio*.

20 Una forma de realización se refiere a un constructo de ácidos nucleicos, en la que una o más proteínas o péptidos antigénicos codificados proceden de un parásito.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende combinaciones de por lo menos dos proteínas o péptidos antigénicos procedentes de cualquiera de los patógenos anteriormente indicados.

25 Preferentemente, el antígeno procede, aunque sin limitación, de un parásito seleccionado de entre el grupo de especies de *Plasmodium* tales como *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Endolimax nana*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium muris*, *Pneumocystis carinii*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, especies de *Acanthamoeba* tales como *Acanthamoeba castellanii* y *A. culbertsoni*, *Naegleria fowleri*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Isospora belli*, *Balantidium coli*, ascáride (*Ascaris lumbricoides*), anquilostoma (*Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*), oxiuro (*Enterobius vermicularis*), ascáride (*Toxocara canis*, *Toxocara cati*), gusano *Dirofilaria* (*Dirofilaria immitis*), *Strongyloides* (*Strongyloides stercoralis*), *Trichinella* (*Trichinella spiralis*), Filaria (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi*) y larvas de Anisakis (*Anisakis simplex* (gusano del arenque), *Pseudoterranova* (*Phocanema*, *Terranova*) *decipiens* (gusano del bacalo o de la foca), especies de *Contracaecum* e *Hysterothylacium* (especies de *Thynnascaris*), *Trichuris trichiura*, tenia del ganado vacuno (*Taenia saginata*), tenia del cerdo (*Taenia solium*), tenia de los peces (*Diphyllobothrium latum*) y tenia del perro (*Dipylidium caninum*), trematosis intestinal (*Fasciolopsis buski*), duela sanguínea (*Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*), duela hepática (*Clonorchis sinensis*), duela pulmonar oriental (*Paragonimus westermani*) y duela hepática ovina (*Fasciola hepatica*), *Nanophyetus salmincola* y *N. schikhobalowi*.

45 En una forma de realización preferida de la invención una o más proteínas o péptidos antigénicos proceden de un parásito seleccionado de entre el grupo de: especies de *Plasmodium*, especies de *Leishmania* y especies de *Trypanosoma*.

50 Un aspecto de la presente invención se refiere a antígenos y/o secuencias antigénicas derivadas de enfermedades o agentes que infectan los animales domésticos, especialmente animales comercialmente relevantes tales como cerdos, vacas, caballos, ovejas, cabras, llamas, conejos, visones, ratones, ratas, perros, gatos, aves de corral tales como pollos, pavos, faisanes y otros, peces tales como trucha, salmón y otras especies de piscifactoría. Entre los ejemplos de enfermedades o agentes de los que puede derivarse por lo menos un antígeno o secuencia antigénica se incluyen, aunque sin limitación: enfermedades de múltiples especies, tales como el ántrax, la enfermedad de Aujeszky, enfermedad de la lengua azul, brucelosis, tal como *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* o *Brucella suis*, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, equinococcidiosis/hidatidosis, virus de la familia *Picornaviridae*, género aftovirus causante de la enfermedad de la fiebre aftosa, especialmente cualquiera de los siete serotipos diferenciados inmunológicamente: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 ó Heartwater, encefalitis japonesa, leptospirosis, gusano barrenador del Nuevo Mundo (*Cochliomyia hominivorax*), gusano barrenador del Viejo Mundo (*Chrysomya bezziana*), paratuberculosis, fiebre Q, rabia, fiebre del valle del Rift, peste bovina, triquinosis, tularemia, estomatitis vesicular o fiebre del Nilo Occidental; enfermedades del ganado vacuno, tales como anaplasmosis bovina, babesiosis bovina, campilobacteriosis genital bovina, encefalopatía esponjiforme bovina, tuberculosis bovina, diarrea vírica bovina, pleuroneumonía bovina contagiosa, leucosis bovina enzoótica, septicemia hemorrágica, rinotraqueitis bovina infecciosa/vulvovaginitis pustular infecciosa, dermatosis nodular contagiosa, fiebre catarral maligna, teileriosis, tricomonosis o tripanosomosis (transmitida por la mosca Tsé-Tsé); enfermedades ovinas y bovinas tales como: artritis/encefalitis caprina, agalactia contagiosa, pleuroneumonía caprina contagiosa, aborto enzoótico de las ovejas (clamidiosis ovina), Maedi-visna, enfermedad ovina de Nairobi, epididimitis ovina (*Brucella*

ovis), peste de pequeños rumiantes, salmonelosis (*S. abortusovis*), tembladera ("Scrapie"), viruela ovina y viruela caprina; enfermedades equinas tales como: peste equina africana, metritis equina contagiosa, dourina, encefalomielitis equina (Oriental), encefalomielitis equina (Occidental), anemia infecciosa equina, influenza equina, piroplasmosis equina, rinoneumonitis equina, arteritis vírica equina, muermo, surra (*Trypanosoma evansi*) o encefalomielitis equina venezolana; enfermedades porcinas tales como: fiebre porcina africana, fiebre porcina clásica, encefalitis vírica Nipah, cisticercosis porcina, síndrome reproductor y respiratorio porcino, enfermedad vesicular porcina o gastroenteritis transmisible; enfermedades aviarias tales como: clamidiosis aviaria, bronquitis infecciosa aviaria, laringotraqueitis infecciosa aviaria, micoplasmosis aviaria (*M. gallisepticum*), micoplasmosis aviaria (*M. synoviae*), hepatitis vírica del pato, cólera aviaria, tifosis aviaria, gripe aviaria altamente patógena, siendo cualquiera de entre virus de la gripe A o B y especialmente H5N1, enfermedad infecciosa de la bursa (enfermedad de Gumboro), enfermedad de Marek, enfermedad de Newcastle, enfermedad de Pullorum o rinotraqueitis del pavo; enfermedades de lagomorfos y roedores tales como: enteritis vírica, mixomatosis o enfermedad hemorrágica del conejo; enfermedades de los peces tales como: necrosis hematopoyética epizootica, necrosis hematopoyética infecciosa, viremia primaveral de la carpa, septicemia hemorrágica vírica, necrosis pancreática infecciosa, anemia infecciosa del salmón, síndrome ulceroso epizootico, enfermedad renal bacteriana (*Renibacterium salmoninarum*), girodactilosis (*Gyrodactylus salaris*), enfermedad iridovírica de la brema del Mar Rojo, u otras enfermedades tales como la viruela de los camélidos o la leishmaniosis.

En una forma de realización preferida de la invención, una o más proteínas o péptidos antigénicos son de la enfermedad de Aujeszky, fiebre aftosa, virus de la estomatitis vesicular, gripe aviaria o enfermedad de Newcastle.

Todavía otra forma de realización preferida de la presente invención se refiere a que por lo menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de dicha proteína o péptido antigénico, es un péptido o proteína antigénico con una identidad de por lo menos 85% respecto a cualquiera de los antígenos anteriormente indicados. La homología o identidad entre aminoácidos puede calcularse mediante cualquiera de las matrices de puntuación BLOSUM anteriormente indicadas.

Una forma de realización de la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos, en el que una o más proteínas o péptidos antigénicos o fragmento de proteína o péptido antigénico proceden de un polipéptido específico de cáncer o antígeno de cáncer.

Se han identificado y asociado muchas proteínas/glucoproteínas a determinados tipos de cáncer; éstas se denominan polipéptidos específicos de cáncer, antígenos asociados a tumor o antígenos del cáncer. En general, puede utilizarse cualquier antígeno que se observe que está asociado a tumores cancerosos. Un modo en el que pueden encontrarse antígenos específicos de cáncer es mediante análisis de sustracción, tales como diversos análisis de micromatrices, tales como el análisis de micromatrices del ADN. En estos, se compara el patrón de expresión génica (tal como se observa en el nivel de ARN o proteína codificada por dichos genes) entre pacientes sanos y con cáncer, entre grupos de pacientes con cáncer o entre tejido sano y canceroso en el mismo paciente. Los genes que presentan niveles de expresión aproximadamente iguales se "sustraen" unos de otros, dejando los genes/productos génicos que difieren entre tejido sano y canceroso. Este enfoque es conocido en la técnica y puede utilizarse como método para identificar nuevos antígenos del cáncer o para crear un perfil de expresión génica específico para un paciente o grupo de pacientes dado. Los antígenos identificados de esta manera, tanto los antígenos individuales como las combinaciones en las que pueden haberse encontrado, se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

Preferentemente, el antígeno o antígenos de la presente invención se derivan, aunque sin limitación, de un polipéptido específico del cáncer seleccionado de entre el grupo de MAGE-3, MAGE-1, gp100, gp75, TRP-2, tirosinasa, MART-1, CEA, Ras, p53, B-catenina, gp43, GAGE-1, BAGE-1, PSA, MUC-1, 2, 3 y HSP-70, TRP-1, gp100/pmel17, beta-HCG, mutantes Ras, mutantes de p53, antígeno del melanoma HMW, MUC-18, HOJ-1, quinasa-4 dependiente de ciclina (Cdk4), caspasa-8, HER-2/neu, virus del papiloma humano, HPV tipo 6, 11, 16, 18, 31 y 33, tirosina quinasa Bcr-Abl, antígeno carcinoembrionario (CEA), telomerasa y T grande de SV40.

En una forma de realización preferida de la invención, por lo menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de proteína o péptido antigénico, procede de un polipéptido específico de cáncer seleccionado de entre el grupo de p53, HER-2/neu, telomerasa y antígeno del melanoma.

Una forma de realización de la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos, en el que por lo menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de una proteína o péptido antigénico, procede de un polipéptido asociado a una respuesta fisiológica anormal. Dicha respuesta fisiológica anormal incluye, aunque sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, reacciones alérgicas, cánceres y enfermedades congénitas. Un listado no limitativo de ejemplos de los mismos incluye enfermedades tales como la artritis reumatoide, el lupus sistémico eritematoso, la esclerosis múltiple, la soriasis y la enfermedad de Crohn.

Conector operativo

Un aspecto de la presente invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos en el que la conexión operativa entre la cadena invariante y la proteína o péptido antigénico o fragmento de proteína o péptido antigénico es una conexión directa o una conexión mediada por una región espaciadora. La expresión "conector operativo" se refiere a una secuencia de nucleótidos o de residuos aminoácidos que unen entre sí dos partes de un constructo de ácidos nucleicos o polipéptido quimérico de manera que se asegura el procesamiento biológico del ácido nucleico o polipéptido. En el caso de que el conector operativo sea una conexión directa, los dos ácidos nucleicos, codificantes cada uno de ellos un marco de lectura abierta o un fragmento de un marco de lectura abierta, se sitúan inmediatamente contiguos entre sí y, de esta manera, también en el mismo marco. En el caso de que el conector operativo se encuentre mediado por una región espaciadora, se inserta una serie de nucleótidos entre los nucleótidos codificantes de la cadena o cadenas invariantes y el péptido o péptidos antigénicos, respectivamente. Se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención disponer de una región espaciadora en la que la región espaciadora es meramente una serie de nucleótidos que une por lo menos dos elementos de la presente invención de manera que se conserven los marcos de lectura abiertos, o la región espaciadora puede codificar una o más señales o elementos separados tal como se define posteriormente en la presente memoria.

En una forma de realización preferida, la invención comprende un conector operativo, en el que el conector operativo es una región espaciadora.

En una forma de realización más preferente, la invención comprende una región espaciadora codificante de por lo menos un epítipo auxiliar para las moléculas del CMH de clase II. Un ejemplo de un epítipo auxiliar es un determinante inmunogénico tal como la toxina diftérica. Se ha demostrado que especialmente la región COOH-terminal del fragmento B de la toxina diftérica es inmunogénico en ratones. Además, HSP70, en parte o en su totalidad, así como otros péptidos inmunogénicos tales como secuencias o péptidos del virus de la gripe o inmunogénicos con un motivo de anclaje a moléculas HLA de clase I y de clase II, también podrían encontrarse codificadas en la región espaciadora del constructo de ácidos nucleicos.

En otra forma de realización preferida, la región espaciadora del constructo de ácidos nucleicos codifica por lo menos un sitio de corte de proteasa. Los sitios de corte de las proteasas lisosómicas, tales como las catepsinas, las aspartato proteasas y las cinc proteasas, así como otras proteasas intracelulares, se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

En todavía otra forma de realización preferida, el conector operativo del constructo de ácidos nucleicos puede comprender por lo menos una secuencia codificante de ARNip o ARNmi. Los ARNip (ARN interfirientes pequeños) y los ARNmi (microARN) presentan como diana ARN endógenos, de una manera específica de secuencia, para la degradación. Un ARNip o ARNmi codificado dentro del constructo de ácidos nucleicos de la presente invención puede, de esta manera, seleccionarse para localizar un producto génico no deseable.

En una forma de realización más preferente, el conector operativo comprende por lo menos un policonector o sitio de clonación múltiple (MCS). Los policonectores y MCS son series de nucleótidos que comprenden secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción, es decir, sitios en los que un enzima de restricción corta el ADN de manera roma o dejando un escalón, facilitando la subclonación de otros fragmentos/secuencias de ADN en el constructo de ácidos nucleicos. Las secuencias de reconocimiento de los policonectores/MCS típicamente son únicas, lo que implica que no pueden encontrarse en ningún otro sitio en el constructo de ácidos nucleicos. Además, el conector operativo puede comprender uno o más codones de parada o terminación que proporcionan la señal para la liberación del polipéptido naciente del ribosoma. El conector operativo también puede comprender por lo menos un IRES (sitio interno de entrada ribosómica) y/o por lo menos un promotor. Un IRES es una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la traducción en medio de una secuencia de ARN mensajero (ARNm) como parte del proceso global de síntesis de las proteínas. Un promotor es una secuencia de ADN que permite que un gen se transcriba. El promotor es reconocido por la ARN polimerasa, que seguidamente inicia la transcripción, ver posteriormente. El promotor puede ser unidireccional o bidireccional.

En una forma de realización muy preferente, el conector operativo que comprende la región entre la cadena invariante y el antígeno o antígenos es un conector operativo que comprende por lo menos un policonector y por lo menos un promotor, y opcionalmente también por lo menos un IRES. Estos elementos pueden situarse en cualquier orden. En una forma de realización preferida adicional, el codón de parada de la cadena invariante ha sido delecionado, y el policonector ha sido clonado en el vector de manera que conserva el marco de lectura abierto, permitiendo la lectura dentro del marco de por lo menos un antígeno que se encuentra insertado en el policonector. Lo anterior presenta la ventaja de facilitar la subclonación de múltiples antígenos en el mismo constructo en una etapa o en múltiples etapas de clonación y de permitir la expresión simultánea de múltiples antígenos en el mismo marco que la cadena invariante. Puede insertarse un codón de parada después del policonector para la terminación de la traducción. La presente forma de realización puede combinarse con cualquiera de los epítopos auxiliares anteriormente indicados, ARNmi/ip o cualquiera de los elementos indicados en la presente memoria.

Una forma de realización de la presente invención se refiere a la colocación del conector operativo en relación a por lo menos una cadena invariante y por lo menos una proteína o péptido antigénico, o fragmento de dicha proteína o péptido, en la que las secuencia codificantes del péptido antigénico se sitúan dentro de la secuencia de la cadena

invariante, en el extremo frontal de la secuencia de la cadena invariante, en la parte terminal de la secuencia de la cadena invariante. Lo anterior se lleva a cabo de manera que se asegura la legibilidad del marco de lectura abierto del constructo, de manera que el péptido antigénico está precedido, circundado o seguido de por lo menos un conector operativo.

5 Una forma de realización preferida de la presente invención se refiere además a la situación del conector operativo en relación a por lo menos una cadena invariante y por lo menos una proteína o péptido antigénico, o fragmento de dicha proteína o péptido antigénico, en la que la secuencia o secuencias codificantes de por lo menos un péptido antigénico preferentemente se sitúan en la parte terminal de la cadena invariante y se inserta un conector operativo entre ellos. La parte terminal es el primer o el último residuo de la cadena invariante o fragmento de la misma.

Combinaciones

15 Se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que el constructo de ácidos nucleicos codifique una pluralidad de elementos. Los elementos son por lo menos una cadena invariante y por lo menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de dicha proteína o péptido. Por lo tanto, se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención una pluralidad de cadenas invariantes, estando cada una de ellas operativamente conectada una a otra y a una pluralidad de proteínas o péptidos antigénicos, o fragmentos de proteínas o péptidos antigénicos, en la que estos también se encuentran operativamente conectados. De esta manera, los elementos del constructo de ácidos nucleicos pueden conectarse operativamente entre sí. Se encuentran comprendidas dentro de la presente invención varias series de cadenas invariantes cada una de las cuales se encuentra operativamente conectada a una proteína o péptido antigénico, o fragmento de dicha proteína o péptido, cada una de entre estas series estando operativamente conectada entre sí.

25 Algunas ventajas y aspectos muy importantes de la presente invención se refieren al hecho de que puede iniciarse cualquier tipo de respuesta inmunológica, por ejemplo respuestas mediadas por células T y respuestas mediadas por anticuerpos, tanto con epítomos que es conocido que son antígenos débiles, como polipéptidos de propiedades antigénicas desconocidas y múltiples epítomos/antígenos simultáneamente.

30 Por lo tanto se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que una forma de realización preferida sea un constructo de ácidos nucleicos codificante de por lo menos una cadena invariante operativamente conectada a una pluralidad de proteínas o péptidos antigénicos, o fragmentos de proteínas o péptidos, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce o más proteínas o péptidos antigénicos, o fragmentos de proteínas o péptidos.

35 El constructo de ácidos nucleicos puede comprender elementos adicionales. Entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, sitios internos de entrada ribosómica (IRES), genes codificantes de proteínas relacionadas con la presentación de antígenos, tales como LAMP, calreticulina y Hsp70, genes codificantes de proteínas relacionadas con la extensión intracelular tales como VP22, Tat del VIH, Cx43 u otras conexas y constituyentes delnexo intercelular, genes codificantes de moléculas de activación de células asesinas naturales (células NK) tales como H60 y citocinas, ovoalbúmina de pollo, o cualquier epítomo de células T auxiliares.

40 En una forma de realización preferida de la presente invención, el constructo de ácidos nucleicos comprende por lo menos un gen codificante de una proteína relacionada con la presentación de antígeno, tal como LAMP, LIMP, calreticulina o Hsp70.

45 En todavía otra forma de realización preferida de la presente invención, el constructo de ácidos nucleicos comprende por lo menos un gen codificante de una proteína relacionada con la extensión intracelular tal como VP22, Cx43, Tat del VIH, otras conexas o constituyentes delnexo intercelular.

Promotor

50 El término promotor se utiliza en la presente memoria para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que se encuentran agrupadas en torno al sitio de inicio para la ARN polimerasa II. Una parte importante de los resultados obtenidos sobre cómo se organizan los promotores se deriva de análisis de promotores víricos, incluyendo los de la timidina quinasa (tk) del VHS y las unidades de transcripción temprana del SV40. Estos estudios, junto con trabajos más recientes, han demostrado que los promotores están compuestos de módulos funcionales discretos, consistiendo cada uno en aproximadamente 7 a 20 pb de ADN y que contienen uno o más sitios de reconocimiento para proteínas activadoras de transcripción. Por lo menos un módulo en cada promotor funciona posicionando el sitio de inicio para la síntesis del ARN. El ejemplo mejor conocido de lo anterior es la caja TATA, aunque en algunos promotores que no presentan una caja TATA, tales como el promotor del gen desoxinucleotidil-transferasa terminal de mamífero y el promotor de los 40 genes tardíos del SV, un elemento discreto superpuesto al sitio de inicio mismo ayuda a fijar la posición del inicio.

65 Algunos elementos promotores adicionales regulan la frecuencia del inicio de transcripción. Típicamente se localizan en la región 30 a 110 pb cadena arriba del sitio de unión, aunque recientemente se ha demostrado que varios

promotores también contienen elementos funcionales cadena abajo del sitio de inicio. El espaciado entre elementos es flexible, de manera que se conserva la función del promotor en el caso de que los elementos se encuentren invertidos o desplazados unos respecto a otros. En el promotor tk, el espaciado entre elementos puede incrementarse hasta 50 pb antes de que empiece a caer la actividad. Dependiendo del promotor, aparentemente los elementos individuales pueden funcionar cooperativamente o independientemente para activar la transcripción. Puede utilizarse en la invención cualquier promotor que pueda dirigir el inicio de transcripción de las secuencias codificadas por el constructo de ácidos nucleicos.

Un aspecto de la presente invención comprende el constructo de ácidos nucleicos, en el que la cadena o cadenas invariantes operativamente conectadas y la secuencia codificante de proteína o péptido antigénico están precedidos por un promotor que posibilita la expresión del constructo.

En un aspecto adicional, el promotor se selecciona de entre el grupo de promotores constitutivos, promotores inducibles, promotores específicos de organismo, promotores específicos de tejido y promotores específicos de tipo celular.

Entre los ejemplos de promotores se incluyen, aunque sin limitación, promotores constitutivos tales como el promotor temprano del virus 40 del simio (SV40), el promotores vírico del tumor mamario de ratón, un promotor repetición terminal larga del virus de la inmunodeficiencia humana, un promotor del virus de Moloney, un promotor del virus de la leucemia aviaria, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR), un promotor de actina humana, un promotor de miosina humana, un promotor de hemoglobina humana, promotor citomegalovirus (CMV) y un promotor de creatina muscular humana; promotores inducibles tales como un promotor metalotionina, un promotor glucocorticoide, un promotor progesterona y un promotor tetraciclina (tet-on o tet-off); promotores específicos de tejido tales como el promotor HER-2 y el promotor asociado a PSA, y promotores bidireccionales que son capaces de iniciar la transcripción en cualquiera de las dos direcciones a partir del promotor.

Entre las ventajas de utilizar un promotor inducible se incluyen la opción de proporcionar una vacuna "dormida" que puede activarse a voluntad. Ésta puede utilizarse en el caso de que la vacunación preferentemente sólo se induzca localmente, y no sistémicamente en el cuerpo (por ejemplo en casos de cáncer), o en el caso de que la vacuna resulte perjudicial para la salud del receptor en el momento de la vacunación.

En una forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos comprende un promotor seleccionado de entre el grupo de promotor del CMV, promotor de SV40 y promotor del VSR.

Vehículo de administración

Un aspecto de la presente invención comprende el constructo de ácidos nucleicos tal como se ha indicado en cualquiera de los anteriormente indicados, comprendido dentro de un vehículo de administración. Un vehículo de administración es una entidad en la que una secuencia de nucleótidos o polipéptido o ambos puede ser transportada desde por lo menos un medio hasta otro medio. Los vehículos de administración generalmente se utilizan para la expresión de las secuencias codificadas dentro del constructo de ácidos nucleicos y/o para la administración intracelular del constructo o el polipéptido codificado en el mismo. Se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que el vehículo de administración sea un vehículo seleccionado de entre el grupo de vehículos basados en ARN, vehículos/vectores basados en ADN, vehículos basados en lípidos, vehículos basados en virus y vehículos basados en células. Entre los ejemplos de dichos vehículos de administración se incluyen, aunque sin limitación, microesferas de polímero biodegradable, formulaciones basadas en lípidos tales como portadores de liposoma, el recubrimiento del constructo sobre partículas de oro coloidal, lipopolisacáridos, polipéptidos, polisacáridos y la pegilación de vehículos víricos.

Una forma de realización preferida de la presente invención se refiere a la administración del constructo de ácidos nucleicos en forma de ADN desnudo mediante técnicas mecánicas o eléctricas. Especialmente el recubrimiento con el constructo de ácidos nucleicos sobre partículas de oro es una forma de realización preferida. La administración del constructo de ácidos nucleicos sobre partículas de oro se lleva a cabo mediante transferencia balística utilizando equipos de bombardeo de partículas, tales como una pistola génica.

Una forma de realización más preferente de la presente invención comprende un virus en forma de vehículo de administración, en el que el virus se selecciona de entre el grupo no limitativo de adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus Vaccinia, virus espumosos, citomegalovirus, virus de bosque de Semliki, poxvirus, vector de virus ARN y vector de virus ADN. Dichos vectores víricos son bien conocidos en la técnica.

Los vectores víricos con frecuencia están formados de dos componentes, un genoma vírico modificado y una estructura de cubierta circundante, aunque en ocasiones se introducen vectores víricos en forma desnuda o recubiertos con proteínas diferentes de las proteínas víricas. La mayoría de los vectores actuales presentan estructuras de cubierta similares a las de un virus de tipo salvaje. Esta estructura empaqueta y protege el ácido nucleico vírico y proporciona los medios para unirse y entrar en las células diana.

Preferentemente, los vectores víricos se modifican a partir de genomas víricos de tipo salvaje para deshabilitar el crecimiento del virus en una célula diana, activando simultáneamente el crecimiento del virus en una célula huésped (por ejemplo una célula de empaquetamiento o auxiliar) utilizada para preparar partículas infecciosas. Los ácidos nucleicos de vectores generalmente incluyen secuencias víricas de acción en cis esenciales para la replicación y empaquetamiento de una línea de células auxiliar y secuencias de control de la expresión para regular la expresión de un polinucleótido que se administra en una célula diana. Otras funciones víricas se expresan en trans en líneas celulares de empaquetamiento o auxiliares específicas tal como es conocido en la técnica.

10 Adenovirus

En una forma de realización más preferente, el vehículo que comprende el constructo de ácidos nucleicos tal como se describe en la presente memoria es un adenovirus. El genoma adenovírico consiste en una molécula de ADN de doble cadena de aproximadamente 36 kb portadora de más de aproximadamente treinta genes necesarios para completar el ciclo de replicación vírico. Los genes tempranos se dividen en 4 regiones (E1 a E4) que resultan esenciales para la replicación vírica, con la excepción de la región E3, que se cree que modula la respuesta inmunológica antivírica del huésped. La región E1 (E1A y E1B) codifica proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico. La expresión de los genes de la región E2 (E2A y E2B) conduce a la síntesis de los polipéptidos necesarios para la replicación vírica. Las proteínas codificadas por la región E3 evitan la citólisis por parte de células T citotóxicas y el factor de necrosis tumoral. Las proteínas codificadas por la región E4 participan en la replicación del ADN, en la expresión y procesamiento de genes tardíos y en la inhibición masiva de la biosíntesis en la célula huésped ("shut off"). Los genes tardíos generalmente codifican proteínas estructuras que contribuyen a la cápside vírica. Además, el genoma adenovírico porta ITR (repeticiones terminales invertidas) 5' y 3' de acción en cis y secuencias de empaquetamiento esenciales para la replicación del ADN. Las ITR alojan orígenes de replicación del ADN, mientras que la región de encapsidación resulta necesaria para el empaquetamiento del ADN adenovírico en las partículas infecciosas (ver, por ejemplo, el documento US 2004/0157307).

En la forma de realización más preferente de la presente invención, el vehículo que comprende el constructo de ácidos nucleicos tal como se indica en la presente memoria es un adenovirus deficiente para la replicación o un adenovirus condicionalmente deficiente para la replicación. Los vectores adenovíricos pueden manipularse para que sean condicionalmente replicantes (vectores CRAAd) con el fin de que se repliquen selectivamente en células específicas (por ejemplo en células proliferantes). En otro aspecto, un vector adenovírico no presenta la capacidad de replicación para la función E1 (por ejemplo mediante delección o mutagénesis total o parcial de E1). El esqueleto adenovírico del vector puede comprender modificaciones adicionales (delecciones, inserciones o mutaciones en uno o más genes víricos). Un ejemplo de una modificación de E2 se ilustra mediante la mutación termosensible en el gen codificante de DBP (proteína de unión a ADN). También puede deleccionarse la totalidad o parte de la región E4 de la secuencia adenovírica. Algunas delecciones adicionales dentro de la región no esencial E3 pueden permitir el incremento del tamaño del polinucleótido que se administra. Sin embargo, puede resultar ventajoso conservar la totalidad o parte de las secuencias E3 codificantes de polipéptidos (por ejemplo de gp19k) que permiten que el virus escape al sistema inmunológico o a reacciones inflamatorias. También pueden utilizarse vectores de segunda generación que conservan las ITR y secuencias de empaquetamiento y que comprenden modificaciones genéticas sustanciales para anular la síntesis residual de los antígenos víricos, con el fin de mejorar la expresión a largo plazo del gen expresado en las células transducidas. El constructo de ácidos nucleicos que se introduce en la célula puede insertarse en cualquier localización del genoma vírico, con la excepción de las secuencias de acción en cis (ver, por ejemplo, el documento US 2004/0157307).

Los adenovirus pueden proceder de cualquier fuente humana o animal, en particular fuentes canina, aviaria, bovina, murina, ovina, felina, porcina o de simio, o alternativamente, puede ser un virus híbrido. Puede utilizarse cualquier serotipo. Sin embargo, los adenovirus humanos resultan preferentes y estos virus se encuentran disponibles, por ejemplo, de la ATCC (American Type Culture Collection).

Una forma de realización preferida de la presente invención comprende un adenovirus tal como el adenovirus ovino, el adenovirus canino de tipo II, el virus Vaccinia Ankara modificado (VAM) o VAM-BN.

Las partículas adenovíricas o cápsides adenovíricas vacías también pueden utilizarse para transferir constructos de ácidos nucleicos o vectores de administración basados en ácidos nucleicos mediante un procedimiento de cointernalización mediado por virus. Este procedimiento puede llevarse a cabo en presencia de uno o más agentes catiónicos tales como policarbenos o vesículas lipídicas que comprenden una o más capas lipídicas.

Las partículas adenovíricas pueden prepararse y propagarse según cualquier técnica convencional en el campo utilizando una línea celular de complementación o un virus auxiliar, que proporciona en trans los genes víricos que faltan y resultan necesarios para la replicación vírica. Las partículas adenovíricas pueden recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo, aunque también de las células tras la lisis y opcionalmente pueden purificarse adicionalmente según técnicas estándares (por ejemplo cromatografía y ultracentrifugación).

La localización específica de tipo celular puede conseguirse utilizando vectores derivados de adenovirus que presenten un rango amplio de huéspedes, mediante la modificación de proteínas de la superficie vírica. Por ejemplo, la especificidad de infección de los adenovirus está determinada por la unión de receptores celulares presentes en la superficie de las células permisivas. A este respecto, las fibras y pentonas presentes en la superficie de la cápside adenovírica desempeñan un papel crucial en las uniones celulares. De esta manera, la localización celular de los adenovirus puede llevarse a cabo mediante la modificación genética del gen vírico codificante de la fibra y/o la pentona, con el fin de generar una fibra y/o una pentona modificadas capaces de interactuar específicamente con receptores de superficie celular únicos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un vector adenovírico que comprende un constructo de nucleótidos codificante de por lo menos un antígeno y por lo menos una proteína o péptido, o fragmento de una proteína o péptido, que estimula una respuesta del CMH-I.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un vector adenovírico, en el que el constructo de nucleótidos codifica por lo menos una proteína o péptido, o fragmento de una proteína o péptido, que estimula una respuesta del CMH-II.

Preferentemente, el vector adenovírico comprende secuencias, en el que por lo menos un antígeno se encuentra operativamente conectado a por lo menos una proteína o péptido estimulador de la respuesta del CMH, o fragmento de una proteína o péptido estimulador de la respuesta del CMH. La proteína o péptido estimulador del CMH, o fragmento de proteína o péptido, preferentemente es una proteína o péptido asociado al CMH. Dicho péptido asociado al CMH puede seleccionarse, aunque sin limitación, de entre el grupo de péptido localizador en el RE, péptido localizador en el Golgi, el péptido localizador en el compartimiento de carga de péptidos endosómicos, lisosomas, MIIC, CIIV, melanosomas, gránulos de secreción y gránulos de Birbeck.

Más preferentemente, el vector adenovírico comprende un péptido localizador en el compartimiento de carga de péptidos endosómicos. Dicho péptido localizador en el compartimiento de carga de péptidos endosómicos puede seleccionarse, aunque sin limitación, de entre el grupo de péptidos señal de clasificación, LAMP, LIMP y cadena invariante.

Todavía más preferentemente, el vector adenovírico comprende por lo menos una proteína o péptido estimulador de la respuesta del CMH, o fragmento de proteína o péptido, y dicha proteína o péptido estimulador de la respuesta del CMH, o péptido o fragmento de proteína o péptido es la cadena invariante.

El vector adenovírico puede comprender además proteínas que ayudan a la extensión del virus o del constructo comprendido en el mismo. Entre dichas proteínas se incluyen conexinas, proteínas relacionadas con elnexo intercelular y proteínas formadoras de poro. Una forma de realización preferida de la presente invención comprende un vector adenovírico que codifica, o que de otro modo comprende, una o más cualesquiera de las proteínas siguientes relacionadas con la extensión intercelular: VP22, Cx43 y Tat del VIH.

Célula recombinante

Un aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el constructo de ácidos nucleicos tal como se ha definido anteriormente. Dicha célula recombinante puede utilizarse como herramienta para la investigación *in vitro*, como vehículo de administración para el constructo de ácidos nucleicos o como parte de un régimen de terapia génica. El constructo de ácidos nucleicos y los vectores basados en ácidos nucleicos según la invención pueden introducirse en las células mediante técnicas bien conocidas y entre las que se incluyen la microinyección de ADN en el núcleo de una célula, la transfección, la electroporación, la lipofección/fusión de liposomas y el bombardeo de partículas. Entre las células adecuadas se incluyen las células autólogas y no autólogas y pueden incluir las células xenogénicas.

En una forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos de la presente invención se encuentra comprendido dentro de una célula presentadora de antígenos (CPA). Cualquier célula que presente antígenos sobre su superficie asociados a una molécula del CMH se considera una célula presentadora de antígenos. Entre estas células se incluyen, aunque sin limitación, macrófagos, células dendríticas, células B, CPA híbridas y CPA nodriza. Los métodos de preparación de CPA híbridas son bien conocidos de la técnica.

En una forma de realización más preferente, la CPA es una célula presentadora de antígenos profesional y más preferentemente la CPA es una célula que expresa CMH-I y/o CMH-II.

La CPA según se ha indicado anteriormente puede ser una célula madre obtenida de un paciente. Tras introducir el constructo de ácidos nucleicos de la invención, la célula madre puede reintroducirse en el paciente en un intento de tratar una condición médica en el paciente. Preferentemente, la célula aislada del paciente es una célula madre capaz de diferenciarse en célula presentadora de antígenos.

Se encuentra comprendido adicionalmente dentro del alcance de la presente invención que la célula presentadora de antígenos que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la presente invención no exprese ninguna señal coestimuladora y que la proteína o péptido antigénico, o fragmento antigénico de dicha proteína o péptido, sea un autoantígeno.

5

Proteínas y anticuerpos quiméricos

Un objeto de la presente invención es la proteína quimérica codificada por los constructos de ácidos nucleicos tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, que comprende por lo menos una cadena invariante operativamente conectada y por lo menos una proteína o péptido antigénico, o fragmento de dicha proteína o péptido antigénico. La expresión "proteína quimérica" se refiere a una proteína genéticamente manipulada que se encuentra codificada por una secuencia de nucleótidos preparada mediante un corte y empalme de dos o más genes completos o parciales o una serie de ácidos nucleicos (no) aleatorios.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo que puede reconocer la proteína quimérica tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria. El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes activas de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos son, por ejemplo, moléculas intactas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas que conservan la actividad inmunológica. Dichos anticuerpos pueden utilizarse para la inmunización pasiva de un animal o para la utilización en un ensayo para la detección de proteínas a las que se une el anticuerpo.

20

Composiciones de vacuna

Un aspecto de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de por lo menos una cadena invariante operativamente conectada con por lo menos una proteína o péptido antigénico o fragmento de dicha proteína o péptido antigénico. De esta manera, la vacuna puede comprender un constructo de ácidos nucleicos tal como se ha definido anteriormente. La vacuna puede utilizarse además a modo de medicamento.

25

La composición de vacuna según la invención puede formularse según métodos conocidos, tal como mediante la mezcla de uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, también conocidos como excipientes o estabilizadores con el agente activo. Estos excipientes pueden resultar aceptables para la administración en cualquier individuo/animal, preferentemente vertebrados, y más preferentemente en seres humanos, ya que resultan no tóxicos para la célula o individuo expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones utilizadas. Con frecuencia el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Pueden encontrarse ejemplos de dichos excipientes, portadores y métodos de formulación en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen, aunque sin limitación, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio, y/o surfactantes no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

35

40

Con el fin de formular una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración efectiva, dichas composiciones contienen según la invención una cantidad efectiva del constructo de ácidos nucleicos, estando comprendido el constructo de ácidos nucleicos dentro de un vehículo de administración o encontrándose codificada la proteína quimérica dentro del constructo de ácidos nucleicos indicada en la presente memoria. Con frecuencia, en el caso de que se vacune con proteínas o polipéptidos codificados por el constructo de ácidos nucleicos de la presente invención, se utiliza un portador como andamiaje mediante acoplamiento de las proteínas o péptidos al mismo y ayudando de esta manera a la inducción de una respuesta inmunológica. La proteína portadora puede ser cualquier portador convencional que incluya cualquier proteína adecuada para presentar determinantes inmunogénicos. Los portadores adecuados típicamente son macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas) y partículas víricas inactivas. Dichos portadores son bien conocidos por el experto ordinario en la materia. Además, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores ("adyuvantes"). La inmunización del animal puede llevarse a cabo con adyuvantes y/o portadores farmacéuticos. Entre las proteínas portadoras convencionales se incluyen, aunque sin limitación, hemocianina de lapa americana, proteínas séricas tales como la transferrina, albúmina de suero bovino o albúmina de suero humano, una ovoalbúmina, inmunoglobulinas u hormonas tales como la insulina. El portador puede encontrarse presente conjuntamente con un adyuvante o de modo independiente del mismo.

45

50

55

60

A continuación, las composiciones de vacuna pretenden comprender composiciones útiles para la utilización profiláctica y terapéutica, incluyendo la estimulación de una respuesta inmunológica en un paciente. Se contempla

65

adicionalmente que la composición de vacuna de la invención no induzca ninguna reacción sistémica o local de toxicidad o ningún otro efecto secundario.

En una forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos de la vacuna se encuentra empaquetado. Entre los medios de empaquetamiento del constructo de ácidos nucleicos se incluyen medios seleccionados de entre, aunque sin limitación, el grupo de: vectores basados en ARN o ADN, portadores basados en lípidos, vectores de expresión víricos, vectores de administración víricos, vehículos basados en células, el recubrimiento de partículas de oro coloidal y las microesferas de polímero biodegradable. De esta manera, cualquiera de los medios de administración anteriormente indicados puede utilizarse con fines de empaquetamiento para la utilización en una composición de vacuna.

En una forma de realización más preferente, los medios de empaquetamiento del constructo de ácidos nucleicos para la vacuna son un vector de expresión vírico seleccionado de entre, aunque sin limitación, el grupo de: adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociado, herpesvirus, virus Vaccinia y vector vírico de ADN.

En una forma de realización todavía más preferente, el constructo de ácidos nucleicos de la vacuna se empaqueta en un vector adenovírico. En la forma de realización más preferente, el constructo de ácido nucleico tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria de la vacuna se empaqueta en un vector adenovírico deficiente para la replicación o condicionalmente deficiente para la replicación. Los vectores adenovíricos se han descrito en detalle anteriormente.

Un aspecto de la invención se refiere a una vacuna que comprende por lo menos dos vectores. Comprende que se empaqueten en por lo menos dos vectores uno o dos cualesquiera constructos diferentes de ácidos nucleicos, siendo estos vectores de un tipo indicado anteriormente en la presente memoria. La invención se refiere además a una vacuna que comprende tres, cuatro, cinco o seis vectores. Nuevamente, estos vectores pueden diferir entre sí o no, y pueden portador constructos de ácidos nucleicos idénticos o diferentes tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria. Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende por lo menos una proteína quimérica codificada por cualquiera de los constructos de ácidos nucleicos indicados en la presente memoria. En el caso de que se utilice una proteína o polipéptido quimérico a modo de inmunógeno, puede producirse mediante expresión de uno o más de los constructos de ADN indicados anteriormente, en una célula recombinante, o puede prepararse mediante síntesis química mediante métodos conocidos de la técnica. Tal como se ha indicado anteriormente, dichas proteínas y/o péptidos quiméricos pueden acoplarse a portadores con el fin de incrementar la respuesta inmunológica a proteínas/péptidos, y pueden administrarse con o sin un adyuvante y/o excipiente.

Adyuvante

Pueden incluirse adyuvantes en la composición de vacuna con el fin de incrementar la respuesta inmunológica específica. De esta manera, resulta de particular importancia identificar un adyuvante que, en combinación con el antígeno o antígenos/constructos de ácidos nucleicos y/o vehículos de administración tales como vehículos adenovíricos (cualquiera de los cuales también puede denominarse determinante inmunogénico), resulta en una composición de vacuna capaz de inducir una fuerte respuesta inmunológica específica. El determinante inmunogénico también puede mezclarse con dos o más adyuvantes diferentes previamente a la inmunización. Las composiciones de vacuna también se denominan composiciones inmunogénicas en el presente texto.

Se ha descrito y utilizado un gran número de adyuvantes para la generación de anticuerpos en animales de laboratorio, tales como ratones, ratas y conejos. En este contexto, la tolerancia a los efectos secundarios es bastante elevada, ya que el objetivo principal es obtener una respuesta de anticuerpos potente. Para la utilización, y para la autorización para su uso en farmacéuticos, y especialmente para la utilización en el ser humano, se requiere que los componentes de la composición de vacuna, incluyendo el adyuvante, sean bien caracterizados. Se requiere además que la composición presente un riesgo mínimo de ninguna reacción adversa, tal como granulomas, abscesos o fiebre.

Una forma de realización de la presente invención se refiere a una vacuna que comprende un adyuvante. En una forma de realización preferida, la composición de vacuna resulta adecuada para la administración en un mamífero, y más preferentemente en un sujeto humano. Por lo tanto, el adyuvante preferente resulta adecuado para la administración en un mamífero y más preferentemente resulta adecuado para la administración en un sujeto humano.

La elección de adyuvante puede seleccionarse adicionalmente a partir de su capacidad de estimular el tipo de respuesta inmunológica deseado, la activación de las células B y/o T y la composición de vacuna puede formularse para optimizar la distribución y presentación a los tejidos linfáticos relevantes.

Los adyuvantes relacionados con la presente invención pueden agruparse según su origen, sea mineral, bacteriano, vegetal, sintético o un producto del huésped. El primer grupo en esta clasificación son los adyuvantes minerales, tales como los compuestos de aluminio. Los antígenos precipitados con sales de aluminio o los antígenos

mezclados o adsorbidos con compuestos de aluminio preformados han sido utilizados extensamente para potenciar respuestas inmunológicas en animales y seres humanos. Se han observado partículas de aluminio en nódulos linfáticos regionales de conejos siete días después de la inmunización, y podría ser que otra función significativa sea el direccionamiento del antígeno a las áreas que contienen células T en los nódulos mismos. Se ha demostrado que la potencia del adyuvante correlaciona con la introducción en los nódulos linfáticos de drenaje. Aunque muchos estudios han confirmado que los antígenos administrados con sales de aluminio conducen a una inmunidad humoral incrementada, la inmunidad mediada por células aparentemente sólo se incrementa ligeramente, según se mide a partir de la hipersensibilidad de tipo retardado. También se ha descrito el hidróxido de aluminio como activador de la ruta del complemento. Este mecanismo podría desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria local, así como en la producción de inmunoglobulinas y la memoria de las células B. Además, el hidróxido de aluminio puede proteger al antígeno frente a un catabolismo rápido. Principalmente debido a su excelente historial de seguridad, los compuestos de aluminio son en la actualidad los únicos adyuvantes utilizados en seres humanos.

Otro grupo grande de adyuvantes son los de origen bacteriano. Pueden purificarse y sintetizarse adyuvantes de origen bacteriano (por ejemplo los dipéptidos muramilo, el lípido A) y se han clonado mediadores del huésped (interleucinas 1 y 2). La última década ha comportado avances significativos en la purificación química de varios adyuvantes de componentes activos de origen bacteriano: *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, lipopolisacárido, adyuvante completo de Freund (FCA) y adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) y adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rathway, N.J.). Son adyuvantes adicionalmente adecuados según la presente invención, por ejemplo, el adyuvante clásico Titermax (Sigma-Aldrich), Iscoms, Quil A, Alun, ver las patentes US nº 58767 y nº 5.554.372, los derivados del lípido A, los derivados de la toxina del cólera, los derivados de la HSP, los derivados del LPS, las matrices de péptidos sintéticos, GMDP y otros, así como las combinaciones con inmunoestimuladores (patente US nº 5.876.735). *B. pertussis* resulta de interés como adyuvante en el contexto de la presente invención debido a su capacidad de modular la inmunidad mediada por células mediante la acción sobre las poblaciones de linfocitos T. Para los lipopolisacáridos y el adyuvante completo de Freund se han identificado y sintetizado las fracciones activas del adyuvante, lo que ha permitido el estudio de las relaciones estructura-función. Estos adyuvantes también se consideran para su inclusión en composiciones inmunogénicas según la presente invención.

Se ha descubierto que los lipopolisacáridos y sus diversos derivados, incluyendo el lípido A, son adyuvantes potentes en combinación con liposomas u otras emulsiones lipídicas. Todavía no se sabe con certeza si podrán producirse derivados con toxicidad suficientemente baja para la utilización general en seres humanos. El adyuvante completo de Freund es el estándar en la mayoría de estudios experimentales.

Puede añadirse aceite mineral a la composición inmunogénica para proteger al antígeno frente al catabolismo rápido.

Pueden utilizarse muchos otros tipos de materiales en composiciones inmunogénicas según la presente invención. Se incluyen productos vegetales tales como la saponina, productos animales tales como la quitina y numerosos compuestos químicos sintéticos.

Los adyuvantes según la presente invención también pueden clasificarse según sus mecanismos de acción propuestos. Este tipo de clasificación necesariamente es algo arbitrario ya que la mayoría de adyuvantes aparentemente funcionan mediante más de un mecanismo. Los adyuvantes pueden actuar mediante localización y administración de antígeno, o mediante efectos directos sobre las células que forman el sistema inmunológico, tales como los macrófagos y los linfocitos. Otro mecanismo por el que los adyuvantes según la invención incrementan la respuesta inmunológica es mediante la creación de un depósito de antígenos. Aparentemente lo anterior contribuye a la actividad adyuvante de los compuestos de aluminio, las emulsiones de aceite, los liposomas y los polímeros sintéticos. La actividad adyuvante de los lipopolisacáridos y dipéptidos muramilo aparentemente está mediada principalmente por la activación de los macrófagos, mientras que *B. pertussis* afecta a tanto macrófagos como linfocitos. Se indican en la patente US nº 5.554.372 ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden resultar útiles incorporados en composiciones inmunogénicas según la presente invención.

De esta manera, los adyuvantes útiles en vacunas tanto profilácticas como terapéuticas según la presente invención pueden ser sales minerales tales como el hidróxido de aluminio y los geles de fosfatos de aluminio o calcio, las emulsiones de aceites y las formulaciones basadas en surfactantes tales como MF59 (detergente microfluidizado estabilizado en una emulsión de aceite en agua), QS21 (saponina purificada), AS02 (SBAS2, emulsión de aceite en agua + monofosforil-lípido A (MPL) + QS21), montánidos ISA 51 e ISA-720 (estabilizado en emulsión de agua en aceite), adyuvante 65 (que contiene aceite de cacahuete, monooleato de márido y monoestearato de aluminio), (RIBI ImmunoChem. Research Inc., Hamilton, Utah), adyuvantes particulares tales como los virosomas (vehículos liposómicos unilamelares que incorporan hemaglutinina de virus de la gripe), AS04 (sal de Al con MPL), ISCOM (complejo estructurado de saponinas y lípidos (tales como el coleterol)), poliláctido-coglicólido (PLG), derivados microbianos (naturales y sintéticos) tales como monofosforil-lípido A (MPL), Detox (MPL + esqueletos de pared celular de *M. phlei*), AGP (RC-529 (monosacárido acilado sintético)), DC_chol (inmunoestimuladores lipoides capaces de autoorganizarse en liposomas), OM-174 (derivado del lípido A), motivos CpG (oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG inmunoestimuladores), toxinas bacterianas modificadas, LT y CT, con efectos

adyuvantes no tóxicos, inmunomoduladores humanos endógenos, por ejemplo hGM-CSF o hIL-12 ó Immudaptin (matriz en tándem C3d), vehículos inertes tales como partículas de oro.

Algunos ejemplos adicionales de adyuvantes comprenden: emulsiones inmunoestimuladoras de aceites (por ejemplo de agua en aceite, de aceite en agua, de agua en aceite en agua, tales como, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund, tal como Montainde[®], Specol; sales minerales tales como, por ejemplo, Al(OH)₃, AlPO₄, productos microbianos, saponinas tales como Qual A, productos sintéticos, así como formulaciones de adyuvantes y complejos inmunoestimuladores (ISCOM) y citocinas, bacterias/componentes inactivados por calor, nanopelotas, LPS, LTA. Un listado de otros adyuvantes utilizados comúnmente se da a conocer en las páginas 6 a 8 del documento WO 03089471, incorporando el listado como referencia en la presente memoria.

Las composiciones inmunogénicas según la invención pueden contener además diluyentes tales como tampones, antioxidantes tales como el ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos, incluyendo la glucosa, la sacarosa o las dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, el glutatión y otros estabilizadores y excipientes. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica no específica son ejemplos de diluyentes apropiados.

Los adyuvantes generalmente se incluyen en las composiciones inmunogénicas en la cantidad indicada en las instrucciones del fabricante.

Administración

Las composiciones de vacuna según la invención pueden administrarse en un individuo en cantidades terapéuticamente efectivas. La cantidad efectiva puede variar según una diversidad de factores, tales como la condición, peso, sexo y edad del individuo. Entre otros factores se incluyen el modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas o veterinarias pueden proporcionarse en el individuo mediante una diversidad de vías, tales como las vías subcutánea, tópica, oral e intramuscular. La administración de las composiciones farmacéuticas se lleva a cabo por vía oral o parenteral. Entre los métodos de administración parenteral se incluyen las administraciones tópica, intraarterial (directamente en el tejido), intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. La presente invención también presenta el objetivo de proporcionar formulaciones farmacéuticas tópicas, orales, sistémicas y parenterales adecuadas para la utilización en los métodos de profilaxis y tratamiento con la composición de vacuna.

Por ejemplo, las composiciones de vacuna pueden administrarse en formas de dosificación oral tales como comprimidos, cápsulas (incluyendo cada una formulaciones de liberación temporizada y sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, soluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones, o mediante inyección. De manera similar, también pueden administrarse por vía intravenosa (tanto de bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión, o intramuscular, utilizando todas formas bien conocidas por el experto ordinario en materia farmacéutica. Puede utilizarse una cantidad efectiva aunque no tóxica de la vacuna, que comprende cualquiera de los compuestos indicados en la presente memoria, a modo de agente profiláctico o terapéutico. Además, se encuentra comprendidas todas y cada una de las formas de dosificación convencionales que es conocido en la técnica que resultan apropiadas para la formulación de una composición inyectable de péptidos inmunogénicos, tal como formas liofilizadas y formas de solución, suspensión o emulsión que contengan, en caso necesario, portadores, diluyentes, conservantes, adyuvantes, componentes tamponadores, etc. convencionales farmacéuticamente aceptables.

Entre los modos preferentes de administración de la composición de vacuna según la invención se incluyen, aunque sin limitación, la administración sistémica, tal como la administración intravenosa o subcutánea, la administración intradérmica, la administración intramuscular, la administración intranasal, la administración oral, la administración rectal, la administración vaginal, la administración pulmonar y generalmente cualquier forma de administración mucosal. Además, se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que los medios para cualquiera de las formas de administración indicadas en la presente memoria se encuentren incluidos en la presente invención.

Una vacuna según la presente invención puede administrarse una vez, o cualquier número de veces, tal como dos, tres, cuatro o cinco veces. La administración de la vacuna más de una vez presenta el efecto de reforzar la respuesta inmunológica resultante. La vacuna puede reforzarse adicionalmente mediante la administración de la vacuna en una forma o parte corporal diferente de la administración anterior. La inyección de refuerzo es una inyección de refuerzo homóloga o heteróloga. Una inyección de refuerzo homóloga es una inyección en la que la primera y posteriores vacunaciones comprenden los mismos constructos y más específicamente el mismo vehículo de administración, especialmente el mismo vector vírico. Una inyección de refuerzo heteróloga es una inyección que comprende constructos idénticos dentro de los diferentes vectores víricos. Eso resulta de especial interés al utilizar la administración adenovírica, ya que el cuerpo humano genera una respuesta inmunológica contra un adenovirus dado si ha sido expuesto previamente al mismo. Por lo tanto, una forma de realización preferida de la presente invención se refiere a la pegilación del vector adenovírico, proporcionando la opción de reforzar con el mismo vector

adenovirico (homólogo). Una forma de realización alternativa y preferente se refiere al refuerzo secuencial de una vacuna con diferentes vectores adenoviricos que comprenden los mismos constructos.

5 Una forma de administración preferente de la vacuna según la presente invención es administrar la vacuna en el área corporal, en el interior o exterior, que más probablemente sea el receptáculo de una infección dada. El receptáculo de infección es el área corporal en que se recibe la infección por ejemplo para el virus de la gripe el receptáculo de infección son los pulmones.

10 La vacuna de la presente invención puede administrarse en cualquier organismo en que resulte beneficiosa, especialmente cualquier animal tal como un animal vertebrado. Se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que los medios y modos de administración de la vacuna se adapten al receptor. Un receptor preferente de la vacuna es un mamífero, y el mamífero se selecciona, en una forma de realización más preferente de la presente invención, de entre el grupo de vacas, cerdos, caballos, ovejas, cabras, llamas, ratones, ratas, monos, perros, gatos y seres humanos. En la forma de realización más preferente, el mamífero es un ser humano.

15 Una forma de realización de la presente invención incluye una composición de vacuna que comprende además un segundo principio activo. El segundo principio activo se selecciona de entre, aunque sin limitación, el grupo de antibióticos, quimioterapéuticos, antialergénicos, citocinas, factores del complemento y moléculas coestimuladoras del sistema inmunológico.

20 Otra forma de realización de la presente invención comprende un kit de partes, en el que el kit incluye por lo menos una composición de vacuna tal como se ha indicado anteriormente, medios para administrar dicha vacuna e instrucciones sobre como utilizarlos. Se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención incluir múltiples dosis de la misma vacuna o de varias vacunas diferentes. En una forma de realización preferida, el kit de partes comprende además un segundo principio activo.

25 La presente invención comprende además un método para inducir una respuesta inmunológica en un animal, que comprende administrar en el animal una vacuna tal como se ha indicado anteriormente. La respuesta inmunológica es, aunque sin limitación, cualquiera de los tipos de respuesta siguientes: una respuesta dependiente del CMH-I, una respuesta dependiente del CMH-I y/o CMH-II, una respuesta dependiente de células T, una respuesta dependiente de células T CD4, una respuesta independiente de células T CD4⁺, una respuesta dependiente de células T CD8⁺ y una respuesta inmunológica dependiente de células B. Otro método comprendido dentro del alcance de la presente invención es el método de proporcionar por lo menos una vacuna tal como se ha indicado anteriormente y administrar dicha vacuna o vacunas en un sujeto por lo menos una vez para el tratamiento o profilaxis de un animal. La invención comprende además el constructo de ácidos nucleicos según lo indicado en la presente memoria, para la preparación de una composición para la producción de una vacuna. Dicha vacuna puede utilizarse, aunque sin limitación, para la inmunización genética de un animal, o para tratar u cuadro clínico en un individuo que lo necesita.

40 Descripción detallada de los dibujos

Figura 1: dibujo esquemático de inserciones en el vector adenovirus. A) Dibujo esquemático del casete de expresión de Ad-GP, B) dibujo esquemático del casete de expresión de Ad-liGP. Se muestra además la situación de diversos epítomos GP del VLCM. Ad-GP: glucoproteína adenovirica, CMV: promotor del citomegalovirus, li: cadena invariante, GP 1-498 del VLCM: glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica, STOP: codón de parada, poliA: señal de poliadenilación del virus SV40.

45 Figura 2: respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a epítomos codificados por adenovirus. Se vacunaron ratones C57BL/6 con 2x10⁷ unidades infecciosas (UIF) de Ad-GP o Ad-liGP en la almohadilla plantar trasera derecha. Los días indicados después de la vacunación se determinó el número de células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de epítomo mediante tinción intracelular para IFN-γ de las células del bazo inducido por el péptido. Las columnas representan medias (M) ± desviaciones estándar (SD) de 3 a 5 animales.

50 Figura 3: respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a epítomos codificados por adenovirus en ratones híbridos F₁. Se vacunaron ratones C57BL/6 x BALC/c (H-2^{bxd}) F₁ con 2x10⁷ UIF de Ad-GP o Ad-liGP en la almohadilla plantar trasera derecha. El día 21 después de la vacunación se determinó el número de células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de epítomo mediante tinción intracelular para IFN-γ de las células de bazo inducido por el péptido. Las columnas representan M ± SD de 4 a 5 animales.

55 Figura 4: La Ad-liGP ejerce efectos estimuladores de las células T CD8⁺ que son independientes de las células T CD4⁺. Se vacunaron ratones MHC-II^{-/-} o C57BL/6 con 2x10⁷ UIF de Ad-GP o Ad-liGP en la almohadilla plantar trasera derecha. El día 21 ó 90 después de la vacunación se determinó el número de células T CD8⁺ o CD4⁺ mediante tinción intracelular para IFN-γ de las células del bazo inducido por el péptido. Las columnas representan M ± SD de 4 animales.

60

65

Figura 5: La Ad-liGP proporciona una protección rápida y superior frente a la infección letal por VLCM. Se vacunaron ratones C57BL/6 con 2×10^7 UIF de Ad-GP o Ad-liGP en la almohadilla plantar trasera derecha. Los días indicados después de la vacunación los animales fueron retados con 20 UFP (unidades formadoras de placa) de VLCM Arm. 53b i.c. (intracerebralmente). Se registró la mortalidad durante 14 días. Cada grupo consistía de 5 a 18 animales. ND significa no hay datos.

Figura 6: La Ad-liGP protege eficientemente frente a una infección con una dosis intravenosa elevada de VLCM. Se vacunaron ratones C57BL/6 con 2×10^7 UIF de Ad-GP o Ad-liGP en la almohadilla plantar trasera derecha. El día 21 después de la vacunación los animales fueron retados con 1×10^6 UFP (unidades formadoras de placa) de VLCM Arm. clon 13 i.v. (vía intravenosa). Ocho días después del reto vírico se determinó el título vírico orgánico. Los puntos representan animales individuales. La línea discontinua representa el límite de detección del ensayo.

Figura 7: La Ad-liGP proporciona una protección superior frente a variantes de VLCM con mutaciones en epítomos inmunodominantes. Se vacunaron ratones C57BL/6 con 2×10^7 UIF de Ad-GP, Ad-liGP o simuladamente infectados en la almohadilla plantar trasera derecha. El día 90 después de la vacunación los animales fueron retados i.c. con 20 UFP del VLCM Arm. 53b con mutaciones en gp33, gp276 o en ambos epítomos. Se registró la mortalidad durante 14 días. Para gp33 nulo y gp276 nulo, cada grupo constaba de 5 animales; para gp33/gp276 doble nulo los grupos eran de 10 animales.

Figura 8: frecuencias de las células T CD8⁺ o CD4⁺ que reaccionan con epítomos específicos del VLCM tras la vacunación con Ad-liGP y el reto con variantes del VLCM con mutaciones en los epítomos inmunodominantes. Los animales supervivientes del experimento ilustrado en la figura 7 se analizaron para las células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de epítomo mediante tinción intracelular para IFN- γ de las células de bazo inducido por péptido. Las columnas representan M \pm SD de 3 a 5 animales.

Figura 9: respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a la vacunación con ADN desnudo-liGP y ADN-GP. Se vacunaron ratones C57BL/6 con ADN recubierto sobre partículas de oro de 1,6 nm a una concentración de 2 μ g de ADN/mg de oro y el complejo de ADN-oro se utilizó para recubrir tubos de plástico de manera que se administrasen 0,5 mg de oro en el ratón en cada inyección (1 μ g de ADN en cada inyección). Se inmunizaron los ratones en la piel abdominal utilizando un dispositivo manual de pistola génica utilizando helio comprimido (400 psi) como fuerza impulsora de las partículas. Los ratones se inocularon cuatro veces a un intervalo de 1 semana y después se dejaron en reposo durante 1 semana antes de la investigación. Se determinó el número de células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de epítomo mediante tinción intracelular para IFN- γ de las células del bazo inducido por péptido. Las columnas representan M \pm SD de 4 a 5 animales.

Figura 10: la vacunación profiláctica con Ad-li-GP incrementa el rechazo del tumor. Se vacunaron ratones C57BL/6 en la almohadilla plantar trasera derecha con 2×10^7 UIF de adenovirus codificante de glucoproteína de longitud completa de VLCM (Ad-GP) o con glucoproteína unida a cadena invariante (Ad-li-GP). Se infectaron controles con adenovirus codificante de β -galactosidasa de longitud completa o con VLCM vivo (10^3 UFP o VLCM Armstrong 53b). Aproximadamente 3 meses después, se retaron todos los ratones mediante inyección subcutánea de 10^6 células del melanoma B16.F10 que expresaba el epítomo GP33 derivado del VLCM. Inicialmente se formó un tumor en todos los animales, aunque la mayoría de los ratones que recibieron Ad-li-GP y VLCM finalmente rechazaron el tumor. Cada grupo constaba de 7 a 10 animales.

Figura 11: la vacunación terapéutica con Ad-li-GP incrementa la duración de vida media en ratones portadores de tumor. Se retaron por vía subcutánea ratones C57BL/6 mediante inyección de 10^6 células de melanoma B16.F10 que expresaban el epítomo GP33 derivado del VLCM. En el momento en que los tumores eran palpables en todos los ratones (día 5 después de la inyección de tumor), los animales fueron vacunados en la almohadilla plantar trasera derecha utilizando 2×10^7 UIF de adenovirus codificante de glucoproteína de longitud completa del VLCM (Ad-GP) o glucoproteína de longitud completa de VLCM unido a cadena variante (Ad-li-GP); los controles se vacunaron con adenovirus codificante de β -galactosidasa de longitud completa o con VLCM vivos (10^3 ufp de VLCM Armstrong 53b). Los ratones se sacrificaron al exceder el tumor 12 mm de longitud u observar ulceración. Los números en negrita en el centro de la figura representan el día medio de muerte tras el reto tumoral. Cada grupo constaba de 7 a 10 animales.

Figura 12: tasa de supervivencia tras la vacunación con Ad-li-VSVGP o Ad-VSVGP. Se vacunaron ratones C57BL/6 en la almohadilla plantar trasera derecha con 2×10^7 UIF de adenovirus codificante de glucoproteína de longitud completa de virus de la estomatitis vesicular (Ad-VSVGP) o glucoproteína de longitud completa de virus de la estomatitis vesicular unido a cadena invariante (Ad-li-VSVGP). (A) Los días indicados se recogieron muestras de suero y se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizadores *in vitro* en un ensayo de reducción de placas; los puntos representan animales individuales. (B) Los días indicados los ratones vacunados se retaron con 10^5 UFP de VSV por vía intranasal y se registró la mortalidad durante los 14 días siguientes. Se ha incluido la supervivencia de los ratones de control (no vacunados) a título comparativo. Cada grupo constaba de 5 a 10 animales.

Figura 13: respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a más epítomos codificados por adenovirus. Se vacunaron ratones C57BL/6 (gripe y OVA) o ratones B6D2 F₁ (M2 y M3 del MHV-68) con 2×10^7 UIF del constructo indicado en la

almohadilla plantar trasera derecha. Los días indicados se determinó el número de células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de epítipo mediante tinción intracelular para IFN- γ de las células del bazo inducido por péptido. "Iso" es el control de isotipo, utilizado para determinar el nivel de fondo. Las columnas representan M \pm SD de 4 ó 5 animales.

5 Figura 14: eficiencia de los constructos de Ad-li-GP en comparación con los constructos de Ad-GP-Lamp-1 medida a partir de las respuestas de células T CD8⁺ a los epítipos codificados por adenovirus. Se vacunaron ratones C57BL/6 con 2x10⁷ IUF del constructo indicado en la almohadilla plantar trasera derecha. El día 21 se determinó el número de células CD8⁺ específicas de epítipo mediante tinción intracelular para IFN- γ de las células del bazo inducida por el péptido. Las columnas representan M \pm SD de 3 animales.

10 Figura 15: vectores basados en policonectores dentro del marco. Se amplificó mediante PCR li sin codón de parada utilizando la secuencia para AsiSI, Swal, Ascl, Pmel, Fsel y un sitio de parada incluido en el cebador 3' y se clonó en el vector pacCMV. El vector resultante se numeró como 770 (ver la secuencia parcial del mismo en SEC ID n° 7). También se construyó un vector correspondiente denominado 768 (ver secuencia parcial del mismo en SEC ID n° 8) sin la secuencia de li incorporada.

15 Figura 16: vectores con sitios IRE2. El vector denominado "pacCMV li MCS IRES2" (numerado como 1163, ver secuencia parcial del mismo en SEC ID n° 9) se construyó mediante clonación del IRES2 a partir de pLP-IRES2-EGFP en el vector 770 mediante PCR y digestión con enzimas de restricción. Las secuencias para I-scl y SrfI se incluyeron en el cebador 3'. El primer sitio ATG después de la secuencia IRES inicia la expresión de una segunda proteína. También se construyó un vector correspondiente denominado "pacCMV MCS IRES2" y numerado como 1165 (ver secuencia parcial del mismo en SEC ID n° 10) sin la secuencia de li incorporada.

25 Ejemplos

A continuación se ilustra adicionalmente la invención haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Se apreciará que lo siguiente se proporciona únicamente a título de ejemplo.

30 Ejemplo 1

Respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a epítipos codificados por adenovirus

35 Ratones: se obtuvieron ratones C57BL/6 (H-2b), híbridos C57BL/6 x BALB/c (H-2bxd) F₁ y MHC II^{-/-} (B6.129-H2-Ab1^{tm1Gim} N12 (H-2b)) de Taconic M&B (Ry, Dinamarca). Todos los ratones utilizados eran de 7 a 10 semanas de edad y se alojaron en instalaciones estériles específicas. Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones experimentales locales.

40 Vectores adenovirus: para la construcción de adenovirus con delección de E1 y E3 expresante de antígeno derivado del VLCM fusionado con cadena invariante, se llevó a cabo una PCR en dos etapas. En primer lugar se obtuvieron productos solapantes de PCR que contenían la cadena invariante de ratón de longitud completa y glucoproteína del VLCM de longitud completa y estos se unieron mediante PCR secundaria con cebadores 5' de la cadena invariante y 3' de la glucoproteína. Los adenovirus que expresaban la GP de longitud completa se amplificaron en una PCR de una etapa. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector lanzadera pacCMV. El plásmido obtenido se cotransfectó con el plásmido pJM17 en células HEK293 y se obtuvieron lisados víricos. Estos se clonaron mediante purificación de placas antes de la secuenciación, producción a gran escala y purificación mediante centrifugación en gradiente de CsCl tal como se encuentra descrito (Becker *et al.*, Methods Cell Biol. 43(parte A):161-189, 1994). Se determinó la infectividad de las reservas de adenovirus utilizando el kit Adeno-X Rapid Titer (Clontech). Todas las reservas de virus no modificadas presentaban proporciones de partícula/UIF de entre 46 y 201.

50 Vacunaciones: en todos los estudios, los ratones destinados a vacunación se anestesiaron y recibieron una inyección de 2x10⁷ unidades infecciosas en la almohadilla plantar trasera derecha en un volumen de 0,03 ml.

55 Infección por virus: los ratones se infectaron i.c. con 20 ufp de VLCM Armstrong clon 53b en un volumen de 0,03 ml, o i.v. con 10⁶ ufp de clon 13 del VLCM en 0,3 ml. La infección i.c. induce una meningitis fatal mediada por células T CD8⁺ de la que sucumben los ratones inmunocompetentes 7 a 10 días p.i. (postinfección) (Christensen *et al.*, Scandinavian Journal of Immunology 40:373-382).

60 Estudio de supervivencia: se utilizó la mortalidad para evaluar la severidad clínica de la meningitis aguda inducida por VLCM. Los ratones se observaron dos veces al día durante un mínimo de 2 semanas después de la inoculación i.c.; las muertes producidas menos de 3 días después de la infección fueron excluidas del análisis.

65 Títulos víricos orgánicos: para determinar los títulos víricos en los órganos, en primer lugar estos se homogeneizaron en PBS, proporcionando suspensiones orgánicas al 10% (v/p) y se prepararon diluciones en serie de 10 veces. A continuación, cada dilución se sembró en placa por duplicado en células MC57G. Cuarenta y ocho horas después de la infección se detectaron los grupos celulares infectados utilizando anticuerpo monoclonal de rata anti-VLCM (VL-4),

anticuerpo de cabra antirata marcado con peroxidasa y o-fenilendiamina (sustrato) (Battegay *et al.*, Journal of Virological Methods 33:191-198, 1991). Se realizó un recuento del número de UFP y los resultados se expresan como UFP/g de tejido.

- 5 Preparaciones celulares: se obtuvieron suspensiones de células individuales mediante presión de los órganos a través de una malla fina de acero.

10 Anticuerpos para citometría de flujo: los anticuerpos monoclonales (mAb) siguientes se obtuvieron de BD PharMingen (San Diego, CA) en forma de anticuerpo de rata antirratón: anti-CD8 conjugado con Cy-cromo, anti-CD44 conjugado con FITC, anti-IFN- γ conjugado con ficoeritrina (PE) y estándar de isotipo IgG₁ conjugado con PE.

15 Análisis de citometría de flujo: la tinción de las células para la citometría de flujo se llevó a cabo según el procedimiento de laboratorio estándar (Andersson *et al.*, Journal of Immunology 152:1237-1245, 1994; Andreasen *et al.*, International Immunology 11:1463-1473, 1999). Para la enumeración de las células T CD8⁺ específicas del VLCM, se incubaron esplenocitos *in vitro* durante 5 horas a 37°C en 5% de CO₂ con el péptido relevante (0,1 μ g/ml) en presencia de monensina (3 μ M, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) e IL-2 recombinante murina (10 unidades/pocillo, R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido). Tras la incubación, se tiñó la superficie de las células, se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron utilizando saponina al 0,5%. A continuación, las células se tiñeron con anti-IFN- γ o control de isotipo IgG1 durante 20 minutos a 4°C. Las muestra se analizaron utilizando un Becton Dickinson FACSCalibur y se seleccionaron por lo menos 10⁴ células mononucleares utilizando una combinación de ángulo bajo y dispersión lateral para excluir las células muertas y los residuos. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando Cell Quest Pro (B&D Biosciences).

25 Se generaron vectores adenovirus deficiente para la replicación que expresaban la glucoproteína de longitud completa del virus de la coriomeningitis linfocítica (Ad-GP) o la glucoproteína de longitud completa del virus de la coriomeningitis linfocítica unida N-terminalmente a cadena invariante murina ((Ad-liGP); para una representación esquemática del casete de expresión, ver la figura 1), mediante métodos estándares (Becker *et al.*, Methods Cell Biol. 43(parte A):161-189), A continuación, se vacunaron ratones C57BL/6 en la pata trasera derecha con 2x10⁷ unidades infecciosas de Ad-GP o Ad-liGP y los ratones se sacrificaron 5, 7, 11, 14, 21, 28, 90, 180 ó 360 días después. Seguidamente se analizó la generación de células T específicas de glucoproteína del VLCM en las células esplénicas. Evidentemente (ver la figura 2), en todos los puntos temporales analizados, Ad-liGP indujo respuestas de células T numéricamente superiores en comparación con Ad-GP, y éstas se aceleraron e incluían respuesta de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺. De esta manera, los números máximos de células T generados tras la vacunación con Ad-liGP se obtuvieron a los 7-14 días de la vacunación, dependiendo del epítipo, mientras que las respuestas con Ad-GP alcanzaron un máximo 21 días después de la vacunación.

Ejemplo 2

40 Respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a epítipos codificados por adenovirus en ratones híbridos F₁:

Debido a que los ratones C57BL/6 son homocigóticos para las moléculas de tanto el MHC de clase I como de clase II en todos los loci, se analizó si Ad-GP y Ad-liGP también podían inducir una respuesta inmunológica en ratones C57BL/6 x BALB/c F₁ que expresaban tanto el haplotipo H-2^b como H2^d. Estos ratones son similares a una población exogámica aunque con haplotipos definidos. Los experimentos se llevaron a cabo tal como anteriormente, aunque los ensayos se limitaron al día 21 después de la vacunación. Tal como puede observarse a partir de la figura 3, Ad-liGP induce eficientemente respuestas de células T CD8⁺ a una multitud de epítipos, mientras que Ad-GP aparentemente funcionó peor que en los ratones C57BL/6 homocigóticos.

Ejemplo 3

50 La Ad-liGP ejerce efectos estimuladores de las células T CD8⁺ que son independientes de las células T CD4⁺:

Debido a que un potencial mecanismo de funcionamiento de li en el incremento de la estimulación de las células T CD8⁺ es la capacidad de transportarse a compartimientos endosómicos y lisosómicos y de estimular las células T CD4⁺ (Diebold *et al.*, Gene Ther. 8:487-493, 2001) a través del CMH de clase II, se llevó a cabo una vacunación de ratones deficientes en el CMH de clase II. Para ello, se vacunaron ratones CMH-II^{-/-} o C57BL/6 con 2x10⁷ UIF de Ad-GP o Ad-liGP en la almohadilla plantar trasera derecha. El día 21 ó 90 después de la vacunación se determinó el número de células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de epítipo mediante tinción intracelular para IFN- γ y de las células del bazo inducido por el péptido. Tal como puede observarse a partir de la figura 4, Ad-liGP induce eficientemente respuesta de células T CD8⁺ dirigidas contra varios epítipos; sin embargo, en ausencia de células T CD4⁺, algunas respuestas fueron inferiores que las observadas en ratones de tipo salvaje.

Ejemplo 4

65 La Ad-liGP proporciona una protección rápida, superior y sostenida frente a la infección letal por VLCM:

Debido a que se observó una respuesta acelerada a Ad-liGP en comparación con Ad-GP, se investigó la capacidad de la vacunación de proporcionar protección tanto 21 días después de la vacunación (pico de Ad-GP) y 3, 5, 7, 14, 60, 90, 180 y 360 días después de la vacunación (figura 5). Notablemente, se encontró que los animales vacunados con Ad-liGP tan sólo 3 días antes estaban protegidos frente a la infección intracerebral por VLCM. La protección proporcionada por Ad-GP sólo era parcial 14 y 21 días después de la infección y no se observó protección el día 60 ó posteriormente. Además, la protección proporcionada por Ad-liGP se prolongó durante 360 días, en cuyo punto Ad-GP ya no protegía frente a la infección intracerebral por VLCM.

Ejemplo 5

La Ad-liGP protege eficientemente frente a la infección intravenosa de dosis elevada por VLCM

Debido a que se había encontrado que Ad-liGP protegía a los ratones frente a una infección localizada aguda, se deseaba investigar si lo mismo era cierto para una infección sistémica de dosis elevada. Por consiguiente, se vacunaron los ratones con Ad-GP, Ad-liGP o vacunación simulada (PBS) y se retaron 21 días después mediante inyección intravenosa de 10^6 unidades formadoras de placa de la cepa clon 13 del VLCM de replicación rápida. Cinco días después los animales fueron sacrificados y se determinaron los títulos infecciosos en los pulmones. Aunque Ad-GP proporcionó una protección significativa a los animales vacunados, Ad-liGP fue superior y redujo los títulos a un nivel igual o inferior al límite de detección del ensayo (figura 6).

Ejemplo 6

Análisis comparativos de nuevos constructos con respecto a la cinética, magnitud de la respuesta, inmunidad de largo plazo y dosis vírica necesaria para la inmunidad.

Todos los constructos indicados posteriormente se analizaron mediante comparaciones entre sí y respecto a Ad-GP y Ad-liGP con respecto a la cinética y magnitud de la respuesta inmunológica, por ejemplo tal como se indica en los Ejemplos 1, 2 y 3; la inmunidad de largo plazo, por ejemplo tal como se indica en los Ejemplos 1, 4 y 5, y la dosis vírica necesaria para la inmunidad.

Nuevos constructos basados en alteraciones de las fusiones de li. En cada constructo se fusionó N-terminalmente la GP codificada por adenovirus con:

1. la secuencia de localización lisosómica de li
2. la secuencia CLIP de li
3. la secuencia KEY de li
4. la secuencia CLIP y la secuencia N-terminalmente contigua a la secuencia CLIP
5. la secuencia CLIP y la secuencia C-terminalmente contigua a la secuencia CLIP
6. la secuencia N-terminalmente contigua a la secuencia CLIP
7. la secuencia C-terminalmente contigua a la secuencia CLIP.

Alteraciones del contexto de la presentación de antígeno. En cada constructo la GP codificada por adenovirus se fusionó:

1. C-terminalmente con LAMP
2. N-terminalmente con el dominio N de la calreticulina
3. C-terminalmente con el dominio N de la calreticulina
4. C-terminalmente con Hsp70
5. N-terminalmente con li y C-terminalmente con el dominio N de la calreticulina (AdliGPCrt)
6. N-terminalmente con li y C-terminalmente con Hsp70 (AdliGPHsp70).

La totalidad de dichos constructos se utilizó además como punto de partida para una serie de constructos en los que tras las fusiones de GP se había introducido un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) y un gen codificante de VP22, tat del VIH o de Cx43.

Alteraciones con respecto a la extensión intercelular. En cada constructo la GP codificada por adenovirus se fusionó:

1. N-terminalmente con VP22 codificado por el virus Herpes simplex
2. N-terminalmente con tat codificado por el VIH
3. N-terminalmente con la conexina 43 (Cx43)
4. N-terminalmente con otras conexinas y constituyentes de los nexos intercelulares. Además, se prepararon constructos en los que tras la GP codificada por adenovirus se había introducido un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) y un gen codificante de VP22, tat del VIH o Cx43 ó de otras conexinas y constituyentes de los nexos intercelulares.

La totalidad de los constructos anteriormente indicados se alteraron adicionalmente de cualquiera de las maneras siguientes:

1. Tras la totalidad de los constructos anteriormente indicados se introdujo un sitio IRES y un gen codificante de una molécula de activación de célula NK (célula asesina natural), por ejemplo H60. Esta alteración proporciona una administración incrementada de señales coestimuladoras y ayuda de citocinas.
2. Todos los constructos anteriormente indicados con sitios IRES, en los que el gen situado cadena abajo se había introducido bajo el control de un promotor separado.
3. Todos los constructos anteriormente indicados con sitios IRES, en los que el gen situado cadena bajo se encuentra codificado, a diferencia de los anteriores, en un vector separado.
4. Todos los constructos anteriormente indicados situados bajo sistemas de promotores inducibles.
5. Todos los constructos anteriormente indicados situados bajo sistemas de promotores específicos de tipo celular y/o inducibles.
6. Todos los constructos anteriormente indicados, en los que la secuencia antigénica GP se sustituye por una secuencia codificante de cualquiera e los antígenos siguientes, algunos de los cuales comprende múltiples antígenos, ver ejemplos de antígenos específicos en las figuras 12 y 13: GP-VSV, NS-1 de gripe-A, M1 de gripe-A, NP de gripe-A, NP del VLCM, GP del VLCM, GP del virus del Ébola, NP del virus del Ébola, M2 y M3 (correspondiente a los virus VEB y VHH8 humanos) del herpesvirus- γ murino (MHV-68) y ORF73, ovoalbúmina de pollo (OVA) o un epítipo de célula T auxiliar. Estas secuencias antigénicas se combinan adicionalmente de manera que por lo menos 2 ó más se encuentren codificadas en el mismo vector.

Ver la figura 14 para un ejemplo de una comparación entre la eficiencia de los constructos Ad-li-GP pg33 y gp276 y los constructos Ad-GP-Lamp-1 pg33 y gp276, medida a partir de las respuestas de células T CD8⁺. Tal como puede observarse, los constructos de Ad-li-GP son superiores a los constructos de Ad-GP-Lamp-1 en su capacidad de inducir una respuesta de células T CD8⁺.

Ejemplo 7

Análisis comparativos de nuevos constructos y métodos alternativos de administración con respecto a la cinética, magnitud de la respuesta, inmunidad de largo plazo y dosis vírica necesaria para la inmunidad.

Todos los constructos indicados en el Ejemplo 6 fueron analizados mediante la comparación unos con otros y con Ad-GP y Ad-liGP siguiendo métodos alternativos de administración. Las comparaciones se realizaron con respecto a la cinética y la magnitud de la respuesta inmunológica, por ejemplo tal como se indica en los Ejemplos 1, 2 y 3; la inmunidad de largo plazo, por ejemplo tal como se indica en los Ejemplos 1, 4 y 5, y la dosis vírica necesaria para la inmunidad.

Entre los métodos alternativos de administración se incluyen:

1. Alteraciones con respecto a la administración incrementada de señales coestimuladoras y ayuda de citocinas, en las que la totalidad de los constructos indicados en el Ejemplo 6 se coinyectaron con interferón de tipo 1 codificado por adenovirus, por ejemplo IFN- β inducible con tetraciclina. Además, todos los constructos indicados en el Ejemplo 6 se coinyectaron con citocina codificada por adenovirus, por ejemplo IL-15.
2. La administración de Ad-liGP simultáneamente con Ad-Tet-onGP en sitios separados del cuerpo (Ad-Te-onGP codifica GP bajo el control de un promotor inducible con tetraciclina).

3. La administración mediante adenovirus de cualquiera de las inserciones/constructos indicados en el Ejemplo 6 seguido del refuerzo con vector vírico homólogo de la misma inserción/constructo o seguido del refuerzo mediante la administración de vector vírico heterólogo con la misma inserción/constructo codificado por lentivirus o por otro adenovirus.

5

Ejemplo 8

La Ad-liGP proporciona una protección rápida y superior frente a la infección letal por VLCM en ausencia de epítomos mayores. La glucoproteína (GP) de longitud completa del virus de la coriomeningitis linfocítica comprende cuatro epítomos específicos de CD8⁺ de diferente antigenicidad, medida por el percentil de células CD8⁺ con especificidad para el epítomo individual frente a la totalidad de células CD8⁺ surgidas en respuesta a la vacunación con GP. La población predominante de células CD8⁺ surgidas contra GP es específica para el epítomo gp33; una población algo menor es específica para gp276 y poblaciones menores son específicas para gp118 y para gp92. Debido a que gp33 y gp276 son los epítomos mayores/inmunodominantes, se investigó cómo las mutaciones nulas de cualquiera de los dos epítomos, independientemente o ambos simultáneamente, afectarían a la eficiencia de la protección ofrecida por el constructo de fusión Ad-liGP.

Se vacunaron ratones C57BL/6 con 2×10^7 UIF de Ad-GP y Ad-liGP o se infectaron simuladamente, en la almohadilla plantar trasera derecha. Cada grupo constaba de 5 animales. El día 90 después de la vacunación los animales se retaron i.c. (por vía intracerebral) con 20 ufp de constructos de VLCM Arm 53 portadores de mutaciones nulas de gp33, mutaciones nulas de gp276 o mutaciones dobles nulas de gp33/gp276. Se registró la mortalidad durante 14 días. Tal como puede observarse a partir de la figura 7, Ad-liGP proporcionó una protección superior frente a la infección letal por VLCM a pesar de las mutaciones nulas de gp33 ó de gp276. La mutación doble nula de gp33/gp276 condujo a la supervivencia de 70% de los animales en comparación con ningún superviviente en los grupos de Ad-GP y simuladamente vacunados.

Los animales supervivientes del experimento anteriormente descrito se analizaron para las células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de epítomo mediante tinción intracelular para IFN- γ en las células del bazo inducido por péptido. Tal como se esperaba y puede observarse a partir de la figura 8, en ausencia de gp33 ó gp276, la especificidad de epítomos mayores de las células T CD8⁺ o CD4⁺ es gp276 ó gp33, respectivamente. En ausencia de ambos gp33/gp276, la especificidad de epítomo mayor de las células T CD8⁺ o CD4⁺ es gp92.

Ejemplo 9

35 Respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ a la vacunación con ADN desnudo-liGP y ADN-GP

Con el fin de explorar una plataforma alternativa para las vacunas de fusión de cadena invariante diferente de la administración adenovírica, se sometió a ensayo la capacidad de liGP y GP en forma de ADN desnudo de inducir células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas de epítomo GP. El ADN desnudo comprendía los fragmentos de GP y li-GP de los vectores adenovíricos ilustrados en la figura 1.

Se vacunaron ratones C57BL/6 con ADN recubierto sobre partículas de oro de 1,6 nm a una concentración de 2 μ g de ADN/mg de oro y el complejo de ADN-oro se recubrió sobre tubos de plástico de manera que se administrasen 0,5 mg de oro (1 μ g de ADN por inyección) en el ratón en cada inyección. Los ratones se inmunizaron en la piel abdominal utilizando un dispositivo manual de pistola génica que utilizaba helio comprimido (400 psi) como la fuerza impulsora de las partículas. Los ratones se inocularon cuatro veces a intervalos de 1 semana y después se dejaron en reposo durante 1 semana antes de iniciar la investigación. Se determinó el número de células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas de epítomo mediante tinción intracelular para IFN- γ en las células del bazo inducido por péptido. Tal como puede observarse a partir de la figura 9, ADN-liGP induce eficientemente respuestas de células T CD8⁺ dirigida contra varios epítomos.

Ejemplo 10

La Ad-liGP proporciona una protección superior frente al reto con células tumorales que expresan el epítomo gp33 del VLCM. Bajo circunstancias normales, las células tumorales expresan varios antígenos diferentes reconocidos por las células T. Para determinar la eficiencia de esta respuesta, se utilizaron células del melanoma B16.F10 que expresaban gp33 del VLCM para retar los animales vacunados.

Se vacunaron ratones C57BL/6 con 2×10^7 UIF de Ad-GP o Ad-liGP en la almohadilla plantar trasera derecha. A modo de control algunos animales se vacunaron con Ad- β -galactosidasa (control negativo) o se infectaron con VLCM (control positivo). El día 90 después de la vacunación/infección, los animales se retaron con 10^6 células tumorales por vía subcutánea y se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral mediante medición del tamaño del tumor. Inicialmente se forma un tumor en todos los animales, pero con el tiempo la respuesta inmunológica contra gp33 eliminará las células tumorales. Cada grupo constaba de 7 a 10 animales. La vacunación profiláctica con Ad-liGP resultó en ratones sin tumores en 70% de los casos, en comparación con sólo 10% en los animales vacunados con Ad-GP, tal como puede observarse en la figura 10.

En muchos casos el tumor ya se ha formado cuando el paciente es visitado por el médico. Para simular esta situación, se inyectaron 10^6 células de tumor B16.F10 por vía subcutánea en ratones C57BL/6. Tras 5 días, los tumores eran identificables por palpación y podían medirse. En este punto temporal, los animales fueron vacunados con 2×10^7 UIF de Ad-GP o de Ad-liGP en la almohadilla plantar trasera derecha. A modo de control algunos animales fueron vacunados con Ad- β -galactosidasa (control negativo) o infectados con VLCM (control positivo). Se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral mediante medición del tamaño del tumor y tras superar este tamaño 12 mm en cualquier dimensión se sacrificaba el animal. Tal como puede observarse a partir de la figura 11, en ratones que habían recibido la vacuna terapéutica de Ad-liGP, la velocidad de desarrollo del tumor era aproximadamente la mitad de la observada en ratones que habían recibido Ad-GP como vacuna terapéutica, medido a partir del número de días transcurridos antes de alcanzar un tamaño tumoral de 12 mm y ser sacrificados.

Ejemplo 11

Para demostrar que el constructo de vacuna también puede inducir una respuesta protectora de anticuerpos se utilizó la infección por el VSV

Virus y cuantificación del virus: se utilizó el virus de la estomatitis vesicular (VSV) del serotipo Indiana a lo largo del presente estudio. Se propagaron reservas de virus en células L929 (ATCC CCL 1) y se almacenaron a -70°C hasta la utilización. La cuantificación del virus se llevó a cabo mediante ensayo de placas sobre monocapas de células L929. Brevemente, se prepararon diluciones en serie de 10 veces del virus en medio esencial mínimo de Eagle (F11) que contenía L-glutamina al 1%, penicilina/estreptomicina al 1%, NaHCO_3 al 5% y suero de feto bovino al 10%. Se añadió 1 ml de cada dilución por duplicado a las monocapas de células L929 en placas de Petri sembradas 48 horas antes. Tras incubar durante 90 minutos a 37°C en 5% de CO_2 , se aspiró el medio que contenía las diluciones de virus y se recubrieron las monocapas con una mezcla de 2,5 ml de agarosa al 1% y 2,5 ml de 2xF11. A continuación, las monocapas se incubaron durante 24 horas a 37°C en 5% de CO_2 antes de teñir con una mezcla de 1 ml de agarosa al 1% y 1 ml de 2xF11 que contenía Neutralred al 1%. Tras 24 horas de incubación adicionales, se realizó un recuento del número de UFP.

Estudio de supervivencia: se utilizó la mortalidad como parámetro para la gravedad de la infección por el VSV, basándose en resultados anteriores de que el título vírico en el SNC se correlaciona fuertemente con los síntomas clínicos (Thomsen *et al.*, *Int. Immunol.* 9:1757-1766, 1997). Se inspeccionaron diariamente los ratones para indicios de parálisis inducida por el VSV y se sacrificaron al observar parálisis grave, y prever que morirían en las 24 horas siguientes.

Ensayo de neutralizaciones de suero: se mezclaron diluciones en serie de dos veces de suero en F11 con volúmenes iguales de virus diluido para contener aproximadamente 100 UFP/ml. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de cada mezcla de suero-virus por duplicado a monocapas de células L929 en placas de Petri y se sometió a ensayo para la presencia de virus residual mediante ensayo de placas (ver la sección Virus y cuantificación de virus). La dilución del suero más alta que redujo el número de placas en por lo menos el 50% se consideró que era el título neutralizador.

Se vacunaron ratones C57BL/6 en la almohadilla plantar trasera derecha con 2×10^7 UIF de adenovirus codificante de glucoproteína de longitud completa del virus de la estomatitis vesicular (Ad-VSV-GP) o glucoproteína unida a cadena invariante (Ad-li-VSV-GP). Los días 7, 14, 21 y 110 después de la vacunación se recogieron muestras de suero y se determinaron los títulos de anticuerpo neutralizador *in vitro* en un ensayo de reducción de placas, figura 12a. Los días 3, 7, 14, 21 y 110 después de la vacunación los animales se retaron con 10^5 UFP de VSV por vía intranasal y se registró la mortalidad durante los 14 días siguientes, figura 12b. Tal como puede observarse en la figura 12, se obtuvieron respuestas prácticamente idénticas en los dos grupos, lo que sugiere que, aunque no es una ventaja, la cadena invariante permite la producción de anticuerpos y no presenta un efecto negativo sobre la producción.

Listado de referencias

Andersson, E. C., J. P. Christensen, O. Marker and A. R. Thomsen. 1994. *Journal of Immunology* 152:1237-1245. Changes in Cell Adhesion Molecule Expression on T Cells Associated with Systemic Virus Infection.

Andreasen, S. Ø., J. P. Christensen, O. Marker and A. R. Thomsen. 1999. *International Immunology* 11:1463-1473. Virus induced non-specific signals cause cell cycle progression of primed CD8+ T cells but do not induce cell differentiation.

Battegay M., S. Cooper, A. Althage, J. Bänziger, H. Hengartner, and R.M. Zinckemagel. 1991. *Journal of Virological Methods* 33:191-198. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates.

Becker, T. C., R. J. Noel, W. S. Coats, A. M. Gomez-Foix, T. Alam, R. D. Gerard, and C. B. Newgard. 1994. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering

Christensen, J. P., O. Marker, A. R. Thomsen. 1994. Scandinavian Journal of Immunology 40:373-382. The role of CD4+ T cells in cell-mediated immunity to LCMV: studies in MHC class I and class II deficient mice.

5 Diebold, S. S., M. Cotten, N. Koch, and M. Zenke. 2001. MHC class II presentation of endogenously expressed antigens by transfected dendritic cells. Gene Ther. 8:487-493.

Morris, C. R., A. J. Reber, J. L. Petersen, S. E. Vargas, and J. C. Solheim. 2004. Association of intracellular proteins with folded major histocompatibility complex class I molecules. Immunol.Res. 30:171-179.

10 Pieters, J. 1997. MHC class II restricted antigen presentation. Curr.Opin.Immunol. 9:89-96.

Sambrook et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

15 Strumtpner-Cuvelette, P., and P. Benaroch. 2002. Biochem. Biophys. Acta., 1542:1-13. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function.

20 Thomsen, R. A., A. Nansen, C. Andersen, J. Johansen, O. Marker, and J. P. Christensen. 1997. International Immunology 9:1757-1766. Cooperation of B cells and T cells is required for survival of mice infected with vesicular stomatitis virus.

Listado de secuencias

25 <110> Københavns Universitet

<120> Aumento de la respuesta inmunológica a partir de vectores adenovíricos

<130> P1124DK00

30 <160> 10

<170> Patente en versión 3.1

35 <210> 1

<211> 1287

<212> ADN

<213> Homo sapiens

40 <220>

<221> CDS

<222> (100)..(750)

<223>

45 <400> 1

```

ctgcagggggg gggggggggg gggggggaca ttggctcttc cttggggagt gatgcacagg      60
aggagaagca ggagctgtcg ggaagatcag aagccagtc atg gat gac cag cgc      114
                                     Met Asp Asp Gln Arg
                                     1           5
gac ctt atc tcc aac aat gag caa ctg ccc atg ctg ggc cgg cgc cct      162
Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met Leu Gly Arg Arg Pro
                                     10           15           20
ggg gcc cgg gag agc aag tgc agc cgc gga gcc ctg tac aca ggc ttt      210
Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe
                                     25           30           35
tcc atc ctg gtg act ctg ctc ctc gct ggc cag gcc acc acc gcc tac      258
Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr
                                     40           45           50
ttc ctg tac cag cag cag ggc cgg ctg gac aaa ctg aca gtc acc tcc      306
Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val Thr Ser

```

ES 2 396 437 T3

55	60	65	
cag aac ctg cag ctg gag aac ctg cgc atg aag ctt ccc aag cct ccc Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys Pro Pro 70 75 80 85			354
aag cct gtg agc aag atg cgc atg gcc acc ccg ctg ctg atg cag gcg Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met Gln Ala 90 95 100			402
ctg ccc atg gga gcc ctg ccc cag ggg ccc atg cag aat gcc acc aag Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met Gln Asn Ala Thr Lys 105 110 115			450
tat ggc aac atg aca gag gac cat gtg atg cac ctg ctc cag aat gct Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His Leu Leu Gln Asn Ala 120 125 130			498
gac ccc ctg aag gtg tac ccg cca ctg aag ggg agc ttc ccg gag aac Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly Ser Phe Pro Glu Asn 135 140 145			546
ctg aga cac ctt aag aac acc atg gag acc ata gac tgg aag gtc ttt Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile Asp Trp Lys Val Phe 150 155 160 165			594
gag agc tgg atg cac cat tgg ctc ctg ttt gaa atg agc agg cac tcc Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser Arg His Ser 170 175 180			642
ttg gag caa aag ccc act gac gct cca ccg aaa gag tca ctg gaa ctg Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys Glu Ser Leu Glu Leu 185 190 195			690
gag gac ccg tct tct ggg ctg ggt gtg acc aag cag gat ctg ggc cca Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys Gln Asp Leu Gly Pro 200 205 210			738
gtc ccc atg tga gagcagcaga ggcggctctc aacatcctgc cagccccaca Val Pro Met 215			790
cagctacagc tttcttgctc ccttcagccc ccagcccctc ccccatctcc caccctgtac			850
ctcatcccat gagaccctgg tgccctggctc tttcgtcacc cttggacaag acaaaccaag			910
tcggaacagc agataacaat gcagcaaggc cctgctgccc aatctccatc tgtcaacagg			970
ggcgtgaggt cccaggaagt ggccaaaagc tagacagatc cccgttctctg acatcacagc			1030
agcctccaac acaaggctcc aagacctagg ctcatggacg agatgggaag gcacagggag			1090
aagggataac cctacacca gaccccaggc tggacatgct gactgtctc tccccccag			1150
cctttggcct tggcttttct agcctattta cctgcaggct gagccactct cttcccttc			1210
cccagcatca ctccccagg aagagccaat gttttccacc catccctccc ccccccccc			1270
cccccccc cctgcag			1287

- <210> 2
- 5 <211> 216
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 2

ES 2 396 437 T3

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala
 20 25 30

Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln
 35 40 45

Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
 50 55 60

Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys
 65 70 75 80

Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro
 85 90 95

Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met
 100 105 110

Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His
 115 120 125

Leu Leu Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly
 130 135 140

Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile
 145 150 155 160

Asp Trp Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu
 165 170 175

Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys
 180 185 190

Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys
 195 200 205

Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met
 210 215

<210> 3
 <211> 648
 5 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(648)
 <223>

<400> 3

ES 2 396 437 T3

atg gat gac caa cgc gac ctc atc tct aac cat gaa cag ttg ccc ata	48
Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Leu Pro Ile	
1 5 10 15	
ctg ggc aac cgc cct aga gag cca gaa agg tgc agc cgt gga gct ctg	96
Leu Gly Asn Arg Pro Arg Glu Pro Glu Arg Cys Ser Arg Gly Ala Leu	
20 25 30	
tac acc ggt gtc tct gtc ctg gtg gct ctg ctc ttg gct ggg cag gcc	144
Tyr Thr Gly Val Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala	
35 40 45	
acc act gct tac ttc ctg tac cag caa cag ggc cgc cta gac aag ctg	192
Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu	
50 55 60	
acc atc acc tcc cag aac ctg caa ctg gag agc ctt cgc atg aag ctt	240
Thr Ile Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Ser Leu Arg Met Lys Leu	
65 70 75 80	
ccg aaa tct gcc aaa cct gtg agc cag atg cgg atg gct act ccc ttg	288
Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Gln Met Arg Met Ala Thr Pro Leu	
85 90 95	
ctg atg cgt cca atg tcc atg gat aac atg ctc ctt ggg cct gtg aag	336
Leu Met Arg Pro Met Ser Met Asp Asn Met Leu Leu Gly Pro Val Lys	
100 105 110	
aac gtt acc aag tac ggc aac atg acc cag gac cat gtg atg cat ctg	384
Asn Val Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Gln Asp His Val Met His Leu	
115 120 125	
ctc acg agg tct gga ccc ctg gag tac ccg cag ctg aag ggg acc ttc	432
Leu Thr Arg Ser Gly Pro Leu Glu Tyr Pro Gln Leu Lys Gly Thr Phe	
130 135 140	
cca gag aat ctg aag cat ctt aag aac tcc atg gat ggc gtg aac tgg	480
Pro Glu Asn Leu Lys His Leu Lys Asn Ser Met Asp Gly Val Asn Trp	
145 150 155 160	
aag atc ttc gag agc tgg atg aag cag tgg ctc ttg ttt gag atg agc	528
Lys Ile Phe Glu Ser Trp Met Lys Gln Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser	
165 170 175	
aag aac tcc ctg gag gag aag aag ccc acc gag gct cca cct aaa gag	576
Lys Asn Ser Leu Glu Glu Lys Lys Pro Thr Glu Ala Pro Pro Lys Glu	
180 185 190	
cca ctg gac atg gaa gac cta tct tct ggc ctg gga gtg acc agg cag	624
Pro Leu Asp Met Glu Asp Leu Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Arg Gln	
195 200 205	
gaa ctg ggt caa gtc acc ctg tga	648
Glu Leu Gly Gln Val Thr Leu	
210 215	

5 <210> 4
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 4

ES 2 396 437 T3

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Leu Pro Ile
 1 5 10 15

Leu Gly Asn Arg Pro Arg Glu Pro Glu Arg Cys Ser Arg Gly Ala Leu
 20 25 30

Tyr Thr Gly Val Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala
 35 40 45

Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu
 50 55 60

Thr Ile Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Ser Leu Arg Met Lys Leu
 65 70 75 80

Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Gln Met Arg Met Ala Thr Pro Leu
 85 90 95

Leu Met Arg Pro Met Ser Met Asp Asn Met Leu Leu Gly Pro Val Lys
 100 105 110

Asn Val Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Gln Asp His Val Met His Leu
 115 120 125

Leu Thr Arg Ser Gly Pro Leu Glu Tyr Pro Gln Leu Lys Gly Thr Phe
 130 135 140

Pro Glu Asn Leu Lys His Leu Lys Asn Ser Met Asp Gly Val Asn Trp
 145 150 155 160

Lys Ile Phe Glu Ser Trp Met Lys Gln Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser
 165 170 175

Lys Asn Ser Leu Glu Glu Lys Lys Pro Thr Glu Ala Pro Pro Lys Glu
 180 185 190

Pro Leu Asp Met Glu Asp Leu Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Arg Gln
 195 200 205

Glu Leu Gly Gln Val Thr Leu
 210 215

- 5 <210> 5
- <211> 2587
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Número de vector 574
- <400> 5

ES 2 396 437 T3

tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc 60
 attatgocca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag 120
 tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt ggcagtacac caatgggagt ggatagcggg 180
 ttgactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc 240
 accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc cgcctcgttg acgcaaatgg 300
 gcggtagcgg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tegttagtg aaccgtcaga 360
 tccggtcgcg cgaattcatg ggtcagattg tgacaatgtt tgaggctctg cctcacatca 420
 tctgatgggt gatcaacatt gtcattattg tgcttatcgt gatcacgggt atcaaggctg 480
 tctacaattt tgccacctgt gggatattcg cattgatcag tttcctactt ctggctggca 540
 ggtcctgtgg catgtacggg ctttaaggag cgcacattta caaaggagt tacciaattha 600
 agtcagtggg gtttgatatt tcacatctga accfagccat gcccaacgca tgttcagcca 660
 acaactccca ccattacatc agtatgggga cttctggact agaattgacc ttcaccaatg 720
 attccatcat cagtcacaac ttttgcaatc tgacctctgc cttcaacaaa aagacctttg 780
 accacacact catgagtata gtttcgagcc tacacctcag tatcagaggg aactccaact 840
 ataaggcagt atcctgcgac ttcaacaatg gcataacat ccaatacaac ttgacattct 900
 cagatcgaca aagtgtctcg agccagtga gaaccttcag aggtagagtc ctgatattgt 960
 ttagaactgc cttcgggggg aaatacatga ggagtggctg gggctggaca ggctcagatg 1020
 gcaagaccac ctgggtgtgc cagacgaggt accaatacct gattatacaa aatagaacct 1080
 gggaaaacca ctgcacatat gcaggtcctt ttgggatgtc caggattctc ctttcccaag 1140
 agaagactaa gttcttcaact aggagactag cgggcacatt cacctggact ttgtcagact 1200
 cttcaggggt ggagaatcca ggtggttatt gcctgaccaa atggatgatt cttgtctcag 1260
 agcttaagtg tttcgggaac acagcagttg cgaatgcaa tgtaaatcat gatgccgaat 1320
 tctgtgacat getgcgacta attgactaca acaaggctgc tttgagtaag ttcaagagg 1380
 acgtagaatc tgcttgcac ttattcaaaa caacagtga tctcttgatt tcagatcaac 1440
 tactgatgag gaaccacttg agagatctga tgggggtgcc atattgcaat tactcaaagt 1500
 tttggtaacct agaacatgca aagaccggcg aaactagtgt ccccaagtgc tggcttgc 1560
 ccaatgggtc ttacttaaat gagaccact tcagtgatca aatcgaacag gaagccgata 1620
 acatgattac agagatggtg aggaaggatt acataaagag gcaggggagt acccccctag 1680
 cattgatgga ccttctgatg ttttccacat ctgcatatct agtcagatc ttcctgcacc 1740
 ttgtcaaaat accaacacac aggcacataa aagggtggctc atgtccaaag ccacaccgat 1800
 taaccaacaa aggaatttgt agttgtggtg catttaaggt gcctgggtga aaaaccgtct 1860
 ggaaaagacg ctgaggtacc cggggatcct ctagagtcga cctgcaggca tgcaagcttg 1920
 ggatctttgt gaaggaacct tacttctgtg gtgtgacata atfggacaaa ctacctacag 1980
 agatttaaag ctctaaggta aatataaaa: ttttaagtgt ataatgtgtt aaactactga 2040
 tctaatgtt ttgtgtattt tagattcaca gtoccaaggc tcatttcagg cccctcagtc 2100
 ctcacagctt gttcatgac ataatacagc ataccacatt tgtagaggtt ttacttgett 2160
 taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attgttgttg 2220
 ttaacttgtt tattgcagct tataatgggt acaataaag caatagcatc acaaatcca 2280
 caataaagc attttttca ctgcattcta gttgtgggtt gtccaaactc atcaatgtat 2340
 ctatcatgt ctggatcgcg gccgcctaga gggaaagggtc tgaggtacga tgagaccgc 2400
 accaggtgca gaccctgcga gtgtggcggg aaacatatta ggaaccagcc tgtgatgctg 2460
 gatgtgaccg aggagctgag gcccgatcac ttgggtgctg cctgcaccgg cgtgagttt 2520
 ggctcagcg atgaagatc agattgaggt actgaaatgt gtggcggtgg ctttaagggtg 2580
 ggaaga 2587

ES 2 396 437 T3

<210> 6
 <211> 3232
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Número de vector 578

10 <400> 6

```

tgtatcatat gccaaagtccg ccccoctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc      60
attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag      120
tcatecgtat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacac caatgggagc ggatagcggc      180
ttgactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagc ttgttttggc      240
acaaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataacct cgcctcgttg acgcaaatgg      300
gcggtaggcg tgtacgggtgg gaggtctata taagcagagc tcgttttagtg aacctgcaga      360
tccggtcgcg cgaattcatg gatgaccaac gcgacctcat ctctaaccat gaacagttgc      420
ccatactggg caaccgcctt agagagccag aaaggtgcag ccgtggagct ctgtacaccg      480
gtgtctctgt cctgggtggc ctgctcttgg ctgggcaggc caccactgct tacttctctg      540
accagcaaca gggccgccta gacaagctga ccatcacctc ccagaacctg caactggaga      600
gccttcgcat gaagcttccg aaatctgcc aacctgtgag ccagatgcgg atggctactc      660
ccttgctgat gcgtccaatg tccatggata acatgctcct tgggcctgtg aagaacgtta      720
ccaagtacgg caacatgacc caggaccatg tgatgcatct gctcacgagg tctggacccc      780
tggagtaccg gcagctgaag gggaccttcc cagagaatct gaagcatctt aagaactcca      840
tggatggcgt gaactggaag atcttcgaga gctggatgaa gcagtggtc tcgtttgaga      900
tgagcaagaa ctccctggag gagaagaagc ccaccgaggc tccacctaaa gagccactgg      960
acatggaaga cctatcttct gcctcgggag tgaccaggca ggaactgggt caagtcaacc     1020
tgatgggtca gattgtgaca atgtttgagg ctctgcctca catcatcgat gaggtgatca     1080
acattgtcat tattgtgctt atcgtgatca cgggtatcaa ggctgtctac aatthtgcca     1140
cctgtgggat attcgattg atcagtttcc tacttctggc tggcaggtcc tgtggcatgt     1200
acggtcttaa gggaccggac atttacaaag gagtttacca atthtaagtca gtggagtttg     1260
atatgtcaca tctgaacctg accatgccca acgcatgttc agccaacaac tcccaccatt     1320
acatcagtat ggggacttct ggactagaat tgaccttcac caatgattcc atcatcagtc     1380
acaacttttg caatctgacc tctgccttca acaaaaagac ctttgaccac aactcatga     1440
gtatagtttc gagcctacac ctccagtatca gagggaaactc caactataag gcagtatcct     1500
gcgacttcaa caatggcata accatccaat acaacttgac attctcagat cgacaaagtg     1560
ctcagagcca gtgtagaacc ttcagaggta gagtcctaga tatgtttaga actgccttcg     1620
gggggaaata catgaggagt ggcctgggct ggacaggctc agatggcaag accacctggt     1680
gtagccagac gagttacaa tacctgatta tacaaaaatag aacctgggaa aacctgca     1740
catatgcagg tccttttggg atgtccagga ttctccttcc ccaagagaag actaagttct     1800
    
```

ES 2 396 437 T3

tcactaggag actagcgggc acattcacct ggactttgtc agactcttca ggggtggaga 1860
atccaggtagg ttattgcctg accaaatgga tgattcttgc tgcagagctt aagtgtttcg 1920
ggaacacagc agttgcgaaa tgcaatgtaa atcatgatgc cgaattctgt gacatgctgc 1980
gactaattga ctacaacaag gctgctttga gtaagttcaa agaggacgta gaatctgcct 2040
tgcacttatt caaaacaaca gtgaattctt tgatttcaga tcaactactg atgaggaacc 2100
acttgagaga tctgatgggg gtgccatatt gcaattactc aaagttttgg tacctagaac 2160
atgcaaagac cggcgaaact agtgtcccca agtgctggct tgtcaccaat ggttcttact 2220
taaatgagac ccacttcagt gatcaaatcg aacaggaagc cgataacatg attacagaga 2280
tgttgaggaa ggattacata aagaggcagg ggagtacccc cctagcattg atggaccttc 2340
tgatgttttc cacatctgca tatctagtca gcatcttctc gcacctgtc aaaataccaa 2400
cacacaggca cataaaagggt ggctcatgtc caaagccaca ccgattaacc aacaaaggaa 2460
tttgtagttg tgggtgcattt aagggtgcctg gtgtaaaaac cgtctggaaa agacgctgag 2520
gtacccgggg atcctctaga gtcgacctgc aggcattgcaa gcttgggac tttgtgaagg 2580
aaccttactt ctgtgggtg acataattgg acaaactacc tacagagatt taaagctcta 2640
aggtaaatat aaaattttta agtgtataat gtgttaaact actgattcta attgtttgtg 2700
tattttagat tcacagtccc aaggctcatt tcaggccctc cagtctcac agtctgttca 2760
tgatcataat cagccatacc acatattgtag aggttttact tgctttaaaa aacctccac 2820
acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgtaaac ttgtttattg 2880
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 2940
tttcaactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 3000
tcgcggccgc ctagagggaa ggtgctgagg tacgatgaga cccgcaccag gtgcagaccc 3060
tgcgagtgtg gcggtaacaa tattaggaac cagcctgtga tgctggatgt gaccgaggag 3120
ctgaggcccc atcacttggg gctggcctgc acccgcctg agtttggtc tagcgatgaa 3180
gatacagatt gaggtactga aatgtgtggg cgtggcttaa ggggtgggaaa ga 3232

- <210> 7
- 5 <211> 1145
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Número de vector 768
- <400> 7

tgatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc 60

ES 2 396 437 T3

```

attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag 120
tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac caatgggagt ggatagcggg 180
ttgaactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc 240
acccaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaacc cgccccgttg acgcaaatgg 300
gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga 360
tccggtcgcg cgaattgtta attaagcgat cgctatttaa ataggcggcg cagtttaaac 420
aggccggcct aaggtaccgg gggatcctct agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggg 480
atctttgtga aggaacctta cttctgtggt gtgacataat tggacaaact acctacagag 540
atltaaagct ctaaggtaaa tataaaattt ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt 600
ctaattgttt gtgtatttta gattcacagt cccaaggctc atttcaggcc cctcagctct 660
cacagtctgt tcatgatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta 720
aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt 780
aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 840
aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 900
tatcatgtct ggatcgcggc cgcttagagg gaaggtgctg aggtacgatg agaccgcgac 960
caggtgcaga cctgcgaggt gtggcggtaa acatattagg aaccagcctg tgatgctgga 1020
tgtgaccgag gagctgaggg ccgatcactt ggtgctggcc tgcaccgcg ctaggtttgg 1080
ctctagcgat gaagatacag attgaggtac tgaaatgtgt gggcgtggct taagggtggg 1140
aaaga 1145

```

- 5 <210> 8
- <211> 1783
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Número de vector 770

<400> 8

```

tgtatcatat gccaaagtccg cccctatttg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc 60
attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag 120
tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac caatgggagt ggatagcggg 180
ttgaactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc 240
acccaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaacc cgccccgttg acgcaaatgg 300

```

ES 2 396 437 T3

goggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga 360
 tccggtcgcg cgaattcatg gatgaccaac gcgacctcat ctctaaccat gaacagttgc 420
 ccatactggg caaccgccct agagagccag aaaggtgcag ccgtggagct ctgtacaccg 480
 gtgtctctgt cctggtggct ctgctcttgg ctgggcagge caccactgct tacttctctgt 540
 accagcaaca gggccgccta gacaagctga ccatcacctc ccagaacctg caactggaga 600
 gccttcgcat gaagcttccg aaatctgcc aacctgtgag ccagatgcgg atggctactc 660
 ccttgctgat gcgtccaatg tccatggata acatgctcct tgggcctgtg aagaactgta 720
 ccaagtacgg caacatgacc caggaccatg tgatgcatct gctcacgagg tctggacccc 780
 tggagtaccc gcagctgaag gggaccttcc cagagaatct gaagcatctt aagaactcca 840
 tggatggcgt gaactggaag atcttcgaga gctggatgaa gcagtggctc ttgtttgaga 900
 tgagcaagaa ctccctggag gagaagaagc ccaccgaggc tccacctaaa gagccactgg 960
 acatggaaga cctatcttct ggctctggag tgaccaggca ggaactgggt caagtcaccc 1020
 tgagcgatcg ctatttaa at aggcgcgcca gttaaacag gccggcctaa ggtaccggg 1080
 gatcctctag agtcgacctg caggcatgca agcttgggat ctttgtgaag gaaccttact 1140
 tctgtggtgt gacataattg gacaaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata 1200
 taaaatttt aagtgtataa tlggttaaac tactgattct aattgtttgt gtattttaga 1260
 ttcacagtc caaggtcat ttcaggcccc tcagtctca cagtctgttc atgatcataa 1320
 tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaa aaacctcca cacctcccc 1380
 tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttggtgttaa cttgtttatt gcagcttata 1440
 atggttaca ataaagcaat agcatcaca atttcacaaa taaagcattt ttttactgc 1500
 attctagttg tggtttgc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcgcggccc 1560
 cctagagggg aggtgctgag gtacgatgag acccgcacca ggtgcagacc ctgcgagtgt 1620
 ggcggtaaac atattaggaa ccagcctgtg atgctggatg tgaccgagga gctgaggccc 1680
 gatcacttgg tgctggcctg caccgcgct gagtttggct ctacgatga agatacagat 1740
 tgaggactg aaatgtgtgg gcgtggctta aggtgggaa aga 1783

- <210> 9
- 5 <211> 2397
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Vector denominado pacCMV li MCS IRES2

<400> 9

ES 2 396 437 T3

tgtatcatat gccaaagtccg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc 60
 attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttccctacttg gcagtacac tacgtattag 120
 tcatcgctat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacac caatggggcgt ggatagcggg 180
 ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatggggagt ttgttttggc 240
 accaaaatca acgggacttt ccaaaaatgtc gtaataaccc cgccccgttg acgcaaatgg 300
 gcggtagggc tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga 360
 tccggtcgcg cgaattcatg gatgaccaac gcgacctcat ctctaaccat gaacagttgc 420
 ccatactggg caaccgccct agagagccag aaaggtgcag ccgtggagct ctgtacaccg 480
 gtgtctctgt cctgggtggt ctgctcttgg ctgggcagge caccactgct tacttctctgt 540
 accagcaaca gggccgccta gacaagctga ccacacctc ccagaacctg caactggaga 600
 gccttcgcat gaagcttccg aaatctgcc aacctgtgag ccagatgcgg atggctactc 660
 ccttgctgat gcgtccaatg tccatggata acatgctcct tgggcctgtg aagaacgtta 720
 ccaagtacgg caacatgacc caggaccatg tgatgcatct gtcacagagg tctggacccc 780
 tggagtaccc gcagctgaag gggaccttcc cagagaatct gaagcatctt aagaactcca 840
 tggatggcgt gaactggaag atcttcgaga gctggatgaa gcagtggctc ttgtttgaga 900
 tgagcaagaa ctccctggag gagaagaagc ccaccgaggc tccacctaaa gagccactgg 960
 acatggaaga cctatcttct ggcctgggag tgaccaggca ggaactgggt caagtacccc 1020
 tgagcgatcg ctatttaa at aggcgcgcca gtttaaacag gccggcctaa ggtacccggg 1080
 gatccgcccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggataaagg 1140
 ccgggtgtcg tttgtctata tgttatttcc caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag 1200
 gggccggaaa cctggccctg tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc 1260
 caaaggaatg caaggtctgt tgaatgtcgt gaaggaagca gttcctctgg aagcttcttg 1320
 aagacaaaca acgtctgtag cgaccctttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag 1380
 gtgcctctgc ggccaaaagc cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaacccca 1440
 gtgccacgtt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa tggctctcct caagcgtatt 1500
 caacaagggg ctgaaggatg ccagaagggt acccattgt atgggatctg atctggggcc 1560
 tcgggtcaca tgctttacat gtgttttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gcccccgaa 1620
 ccacggggac gtggttttcc tttgaaaaac acgatgataa tatggccaca acctagggat 1680
 aacagggtaa tgcccgggct ctagagtoga cctgcaggca tgcaagcttg ggatctttgt 1740
 gaaggaacct tacttctgtg gtgtgacata attggacaaa ctacctacag agatttaaag 1800
 ctctaaggta aatataaaat ttttaagtgt ataatgtgtt aaactactga ttctaattgt 1860
 ttgtgtatth tagattcaca gtcccaaggc tcatttcagg cccctcagtc ctcacagtct 1920

ES 2 396 437 T3

```

gttcatgac ataatcagcc ataccacatt tgtagaggtt ttacttgctt taaaaaacct 1980
ccccacctc ccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attggtgttg ttaacttgct 2040
tattgcagct tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc 2100
atTTTTTca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt 2160
ctggatcgcg gccgcctaga ggaaggtgc tgaggtagca tgagaccgcg accaggtgca 2220
gaccctgcga gtgtggcggg aaacatatta ggaaccagcc tgtgatgctg gatgtgaccg 2280
aggagctgag gcccgatcac ttggtgctgg cctgcacccg cgctgagttt ggctctagcg 2340
atgaagatac agattgaggt actgaaatgt gtgggcgtgg cttaaggggtg ggaaaga 2397

```

- 5 <210> 10
- <211> 1752
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Vector denominado pacCMV MCS IRES2

<400> 10

```

tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc 60
attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag 120
tcacgcctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac caatgggctt ggatagcgtt 180
ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc 240
accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaccc cgccccgttg acgcaaatgg 300
gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga 360
tccggtcgcg cgaattcagc gatogctatt taaataggcg cgccagttta aacaggccgg 420
cctaaggtag ccggggatcc gccctctcc ctccccccc cctaacgtta ctggccgaag 480
ccgcttgaa taaggccggg gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc 540
ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttctagggg 600
tctttccct ctgcctaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc 660
tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaacc 720
cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccagct gtataagata cacctgcaaa 780
ggcggcacaa cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtgaaagag tcaaatggct 840
ctcctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc attgtatggg 900
atctgatctg gggcctcggt gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacg 960
tctaggcccc ccgaaccag gggacgtggt tttccttga aaaacacgat gataatatgg 1020

```

ES 2 396 437 T3

```

ccacaaccta gggataacag ggtaatgccc gggctctaga gtogacctgc aggcattgcaa 1080
gcttgggac tttgtgaagg aaccttactt ctgtggtgtg acataattgg acaaactacc 1140
tacagagatt taaagctcta aggtaaataa aaaattttta agtgtataat gtgttaaact 1200
actgattcta attgtttgtg tatttttagat tcacagtccc aaggctcatt tcaggcccct 1260
cagtcctcac agtctgttca tgatcataat cagccatacc acattttag taggttttact 1320
tgctttaaaa aacctccac acctcccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt 1380
tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 1440
ttcacaaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtt ggtttgtcca aactcatcaa 1500
tgtatcttat catgtctgga tcgcgccgc ctagaggga ggtgctgagg tacgatgaga 1560
cccgcaccag gtgcagacc tcgaggtgtg gcggtaaaca tattaggaac cagcctgtga 1620
tgctggatgt gaccgaggag ctgaggccc atcaactggt gctggcctgc acccgctg 1680
agtttgctc tagcgatgaa gatacagatt gaggtactga aatgtgtggg cgtggcttaa 1740
gggtgggaaa ga 1752

```

REIVINDICACIONES

1. Vector adenovirico que comprende un constructo de nucleotidos codificante de:
- 5 a) por lo menos un antigeno y
- b) por lo menos una proteina o peptido, o fragmento de una proteina o peptido, que estimula una respuesta del CMH-1, en el que dicha por lo menos una proteina o peptido, o fragmento de proteina o peptido, estimulante de la respuesta del CMH-1, es una cadena invariante que presenta por lo menos 85% de identidad a SEC ID n° 2 o a un fragmento de la secuencia identificada en SEC ID n° 2 de por lo menos 40 aminoacidos y por lo menos 85% de identidad al mismo fragmento de SEC ID n° 2, en el que la cadena invariante o el fragmento comprende una region CLIP.
- 10
2. Vector adenovirico segun la reivindicacion 1, en el que por lo menos un peptido seal se aade al, se elimina del o sustituye el peptido seal de por lo menos una cadena invariante.
- 15
3. Vector adenovirico segun cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos una proteina o peptido antigenica o un fragmento antigenico de dicha proteina o peptido se selecciona de entre el grupo de: organismos patogenos, polipeptidos especificos del cancer, y proteinas o peptidos asociados a una respuesta fisiologica anormal o es una proteina o peptido antigenico o un fragmento antigenico de dicha proteina o peptido por lo menos 85% idntico a un antigeno del grupo anterior.
- 20
4. Vector adenovirico segun cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha por lo menos una proteina o peptido antigenica o un fragmento antigenico de dicha proteina o peptido procedente de un organismo patogeno se selecciona de entre el grupo de patogenos que comprende: virus, microorganismos y parasitos, en el que el virus se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en: VIH, virus de la hepatitis C, virus de la gripe, herpesvirus, virus de Lassa, virus del Ebola, virus de la viruela, virus de la gripe aviaria, filovirus, virus de Marburg, papilomavirus o en el que el microorganismo se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en: *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, especies de *Staphylococcus* y especies de *Vibrio*, o en el que el parasito se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en: especies de *Plasmodium*, especies de *Leishmania* y especies de *Trypanosoma*.
- 25
- 30
5. Vector adenovirico segun cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos una proteina o peptido antigenica o un fragmento antigenico de dicha proteina o peptido procede de un polipeptido especifico de cancer.
- 35
6. Vector adenovirico segun cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos una proteina o peptido antigenica o un fragmento antigenico de dicha proteina o peptido procede de un polipeptido asociado a una respuesta fisiologica anormal, en el que la respuesta fisiologica anormal es una enfermedad autoinmunitaria, una reaccion alergica, cancer o una enfermedad congenita.
- 40
7. Vector adenovirico segun cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la conexion operativa entre la cadena invariante o fragmento y la proteina o peptido antigenica o un fragmento antigenico de dicha proteina o peptido se selecciona de entre el grupo de: una conexion directa o una conexion mediada por una region espaciadora.
- 45
8. Vector adenovirico segun la reivindicacion 7, en el que la conexion operativa es una region espaciadora, en el que la region espaciadora codifica por lo menos un epitopo auxiliar para las molculas del CMH de clase II o en el que la region espaciadora codifica por lo menos un sitio de corte de proteasa.
- 50
9. Vector adenovirico segun cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos una cadena invariante o fragmento se encuentra operativamente conectado a por lo menos dos proteinas o peptidos antigenicas o un fragmento antigenico de dicha proteina o peptido.
- 55
10. Vector adenovirico segun cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector es un adenovirus deficiente para la replicacion o un adenovirus condicionalmente deficiente para la replicacion.
- 60
11. Composicion de vacuna que comprende un vector adenovirico que comprende una secuencia de acidos nucleicos que codifica:
- a) por lo menos una proteina o peptido, o fragmento de una proteina o peptido, operativamente conectada, que estimula una respuesta del CMH-1, en la que dicha por lo menos una proteina o peptido o fragmento de proteina o peptido estimulante de la respuesta del CMH-1 es una cadena invariante que presenta por lo menos 85% de identidad a SEC ID n° 2 o a un fragmento de la secuencia identificada en SEC ID n° 2 de por lo menos 40 aminoacidos y por lo menos 85% de identidad al mismo fragmento de SEC ID n° 2, en la que la cadena invariante o el fragmento comprende una region CLIP conectada operativamente a:
- 65

b) por lo menos una proteína o péptido antigénica o un fragmento antigénico de dicha proteína o péptido para la utilización como medicamento.

5 12. Vacuna según la reivindicación 11, que comprende un vector adenovírico como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

13. Vacuna según la reivindicación 11 ó 12, en la que la vacuna comprende unos medios para la administración intramuscular, intravenosa o subcutánea.

10 14. Composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende un segundo principio activo, en la que el segundo principio activo se selecciona de entre el grupo de: antibióticos quimioterápicos, antialérgicos, citocinas y moléculas coestimuladoras del sistema inmunológico.

15 15. Kit de partes que comprende:

- una composición de vacuna que comprende un vector adenovírico según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14,

20 - un instrumento médico u otros medios de administración de dicha vacuna,

- instrucciones de cómo utilizar el kit en partes.

25 16. Utilización del vector adenovírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la producción de una vacuna.

Fig. 1

A) Dibujo esquemático del casete de expresión de Ad-GP



B) Dibujo esquemático del casete de expresión de Ad-liGP

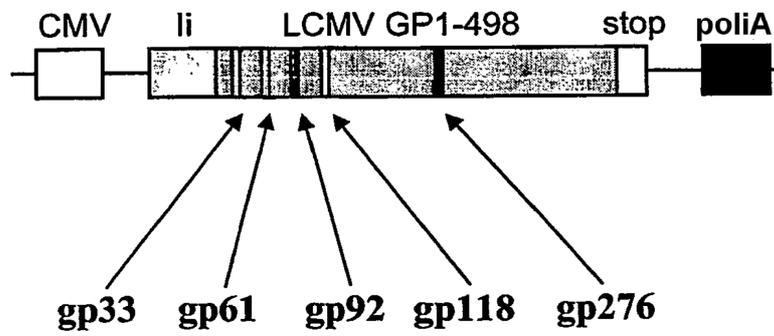


Fig. 2

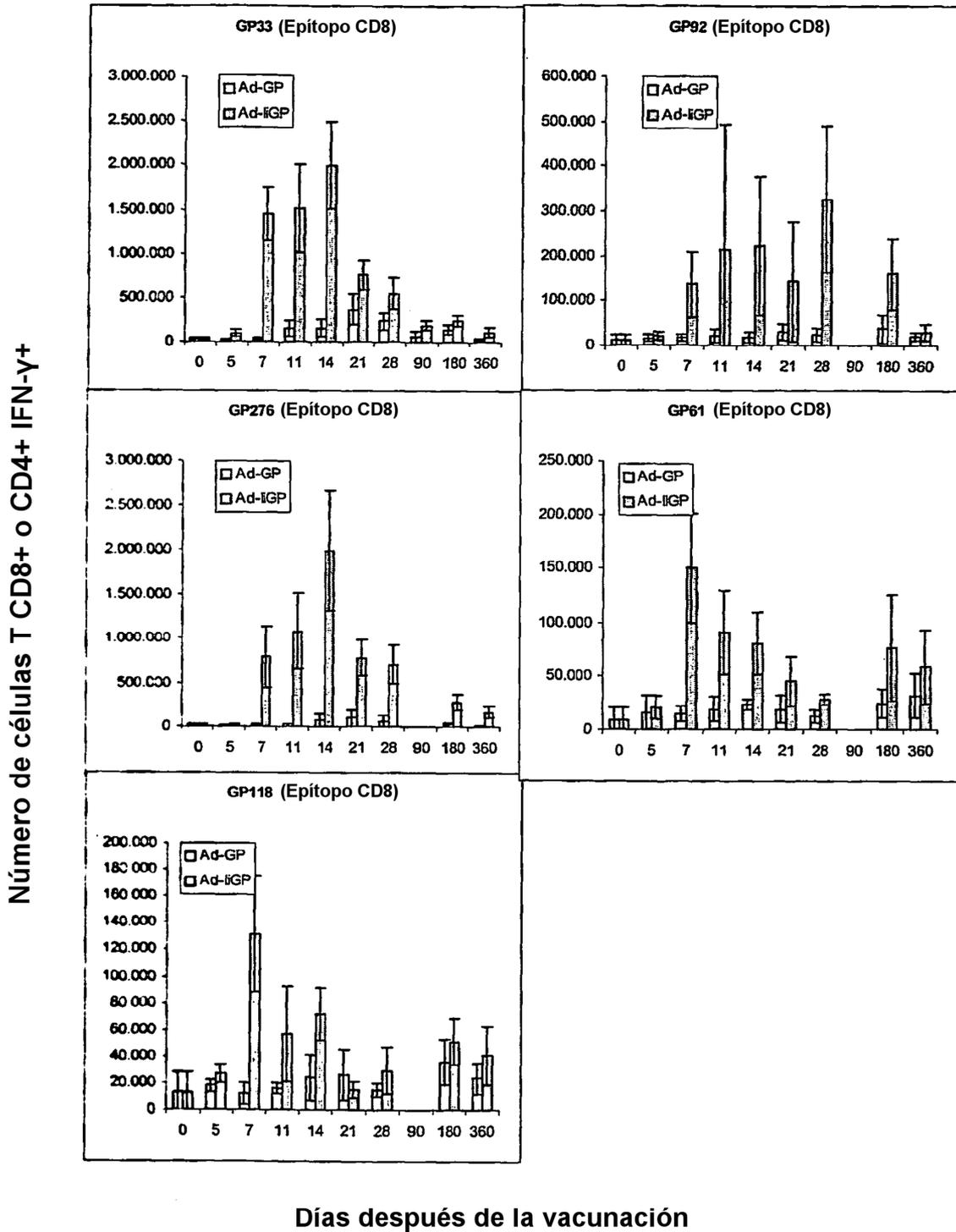


Fig. 3

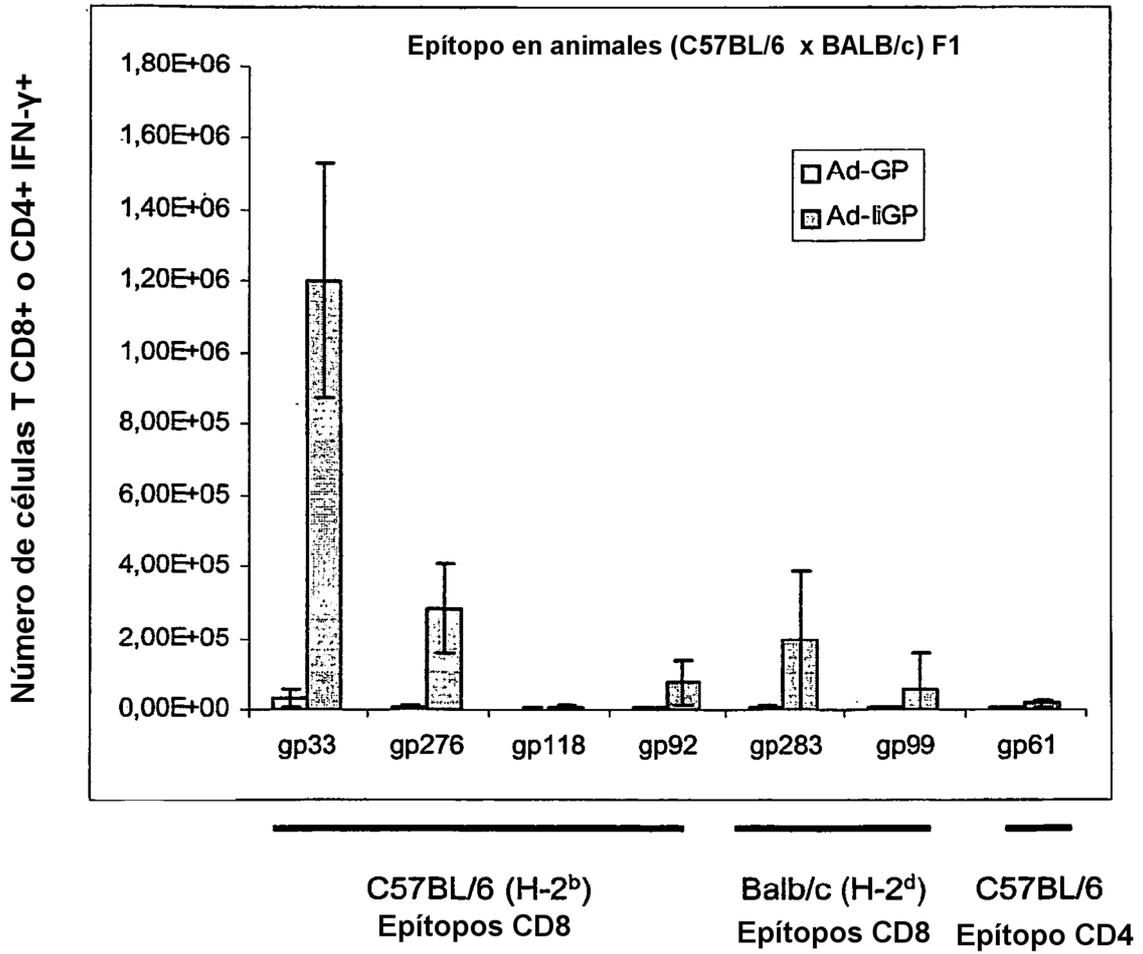


Fig. 4

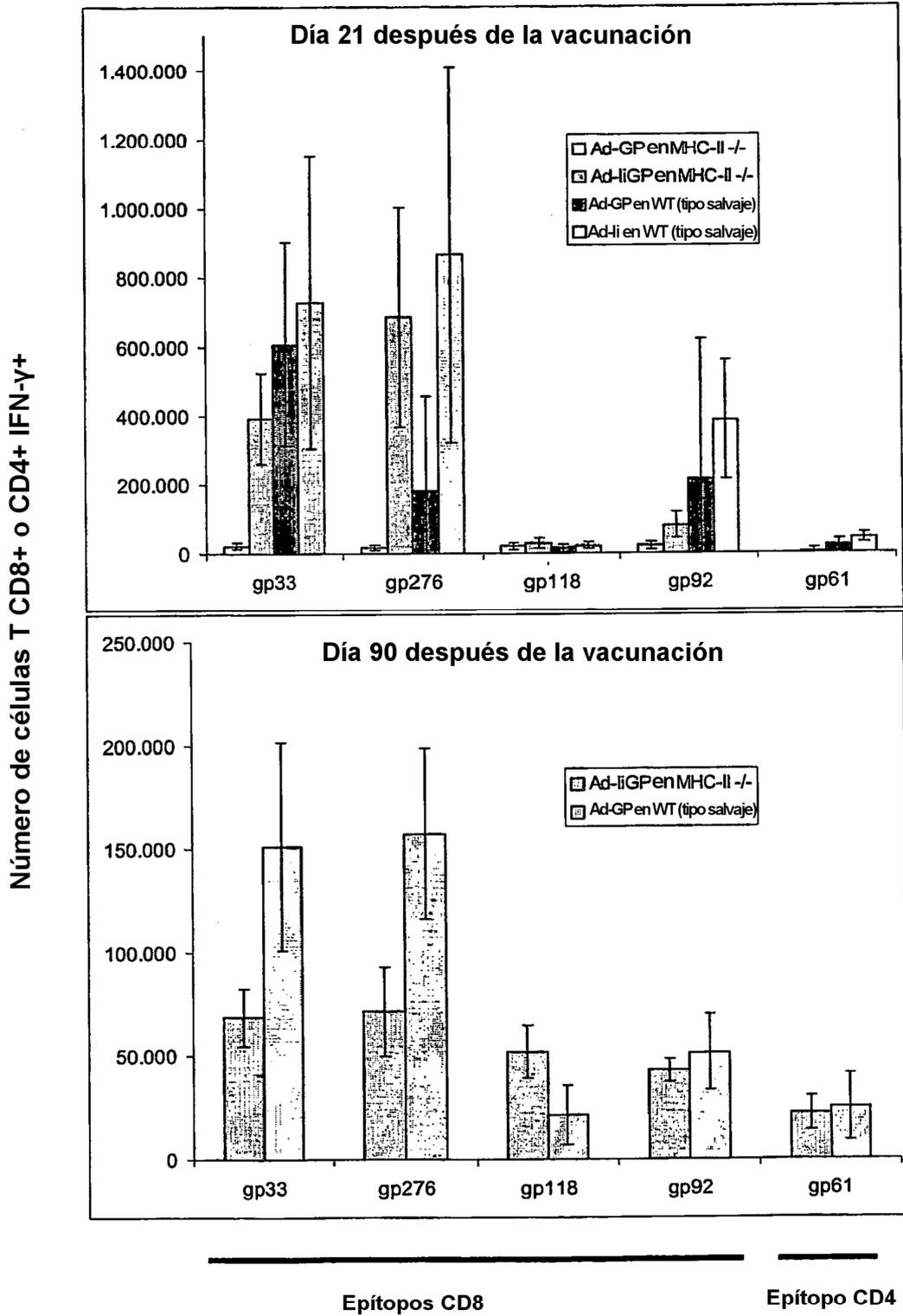


Fig. 5

Días después de vac.	% de animales supervivientes tras reto i.c. (nº de animales en cada grupo)		
	Ad-GP	Ad-liGP	Tratamiento simulado
1	0% (5)	20% (5)	
3	0% (10)	100% (10)	
5	0% (5)	100% (5)	
7	6% (18)	100% (5)	
14	53% (15)	ND	
21	20% (5)	100% (5)	
60	0% (5)	100% (5)	0% (5)
90	0% (5)	100% (5)	0% (5)
180	0% (5)	100% (5)	0% (5)
360	0% (10)	90% (10)	0% (5)

Fig. 6

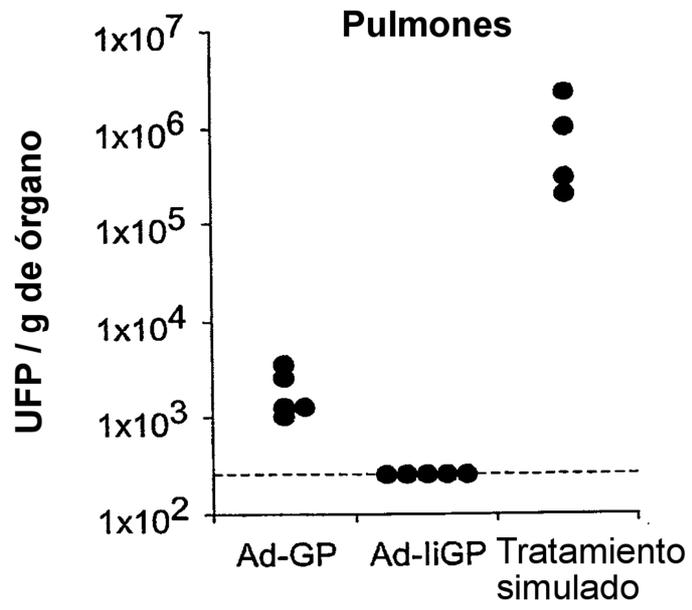


Fig. 7

% de animales supervivientes

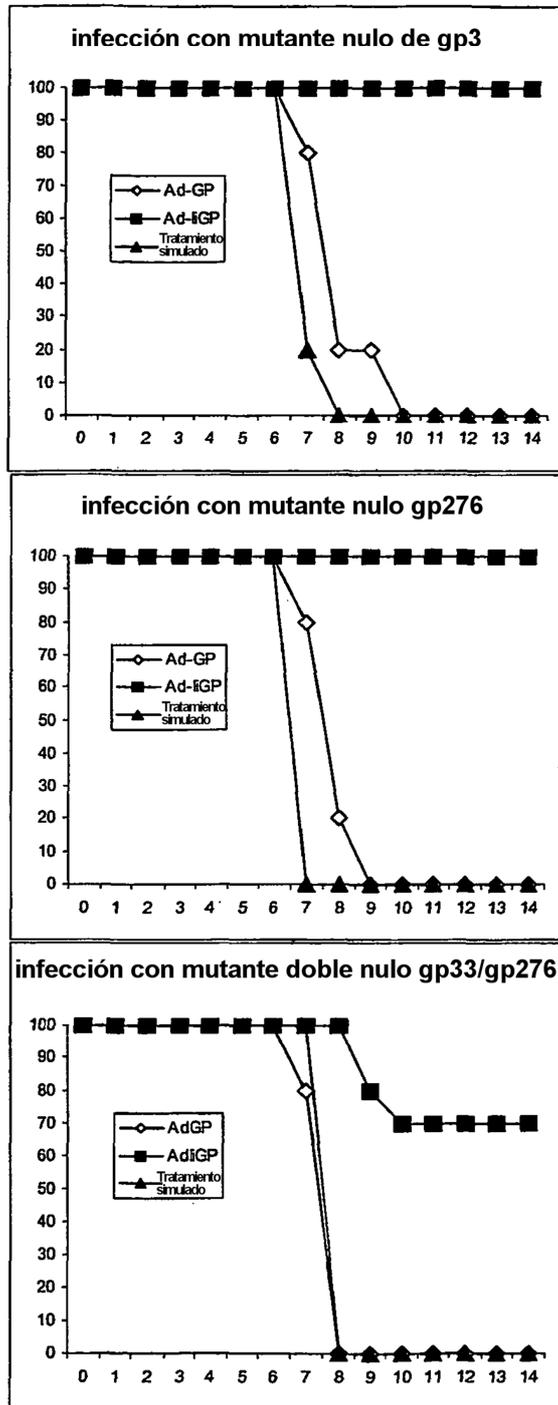


Fig. 8

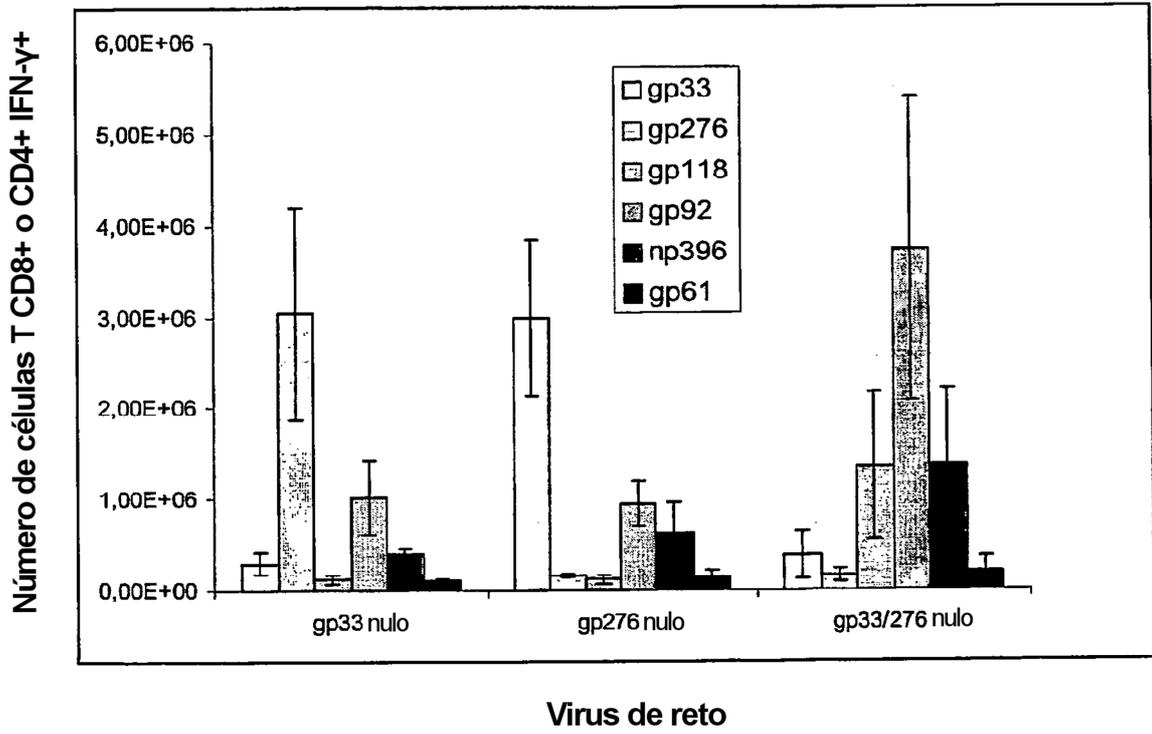


Fig. 9

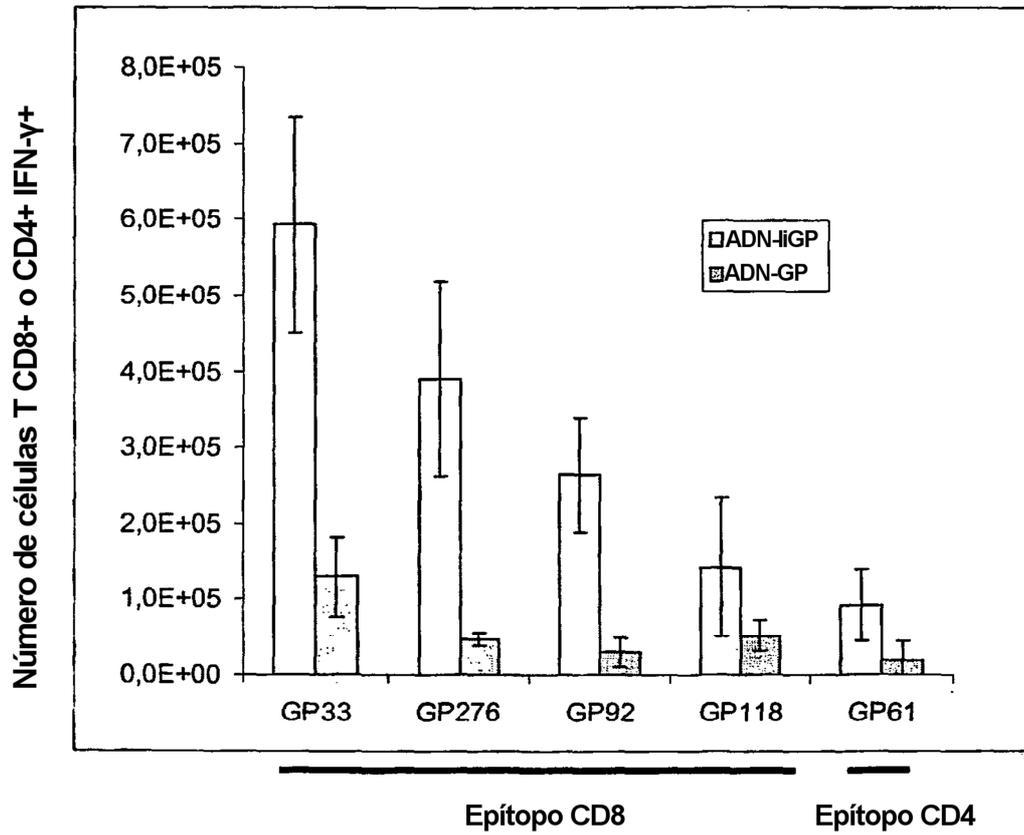


Fig. 10

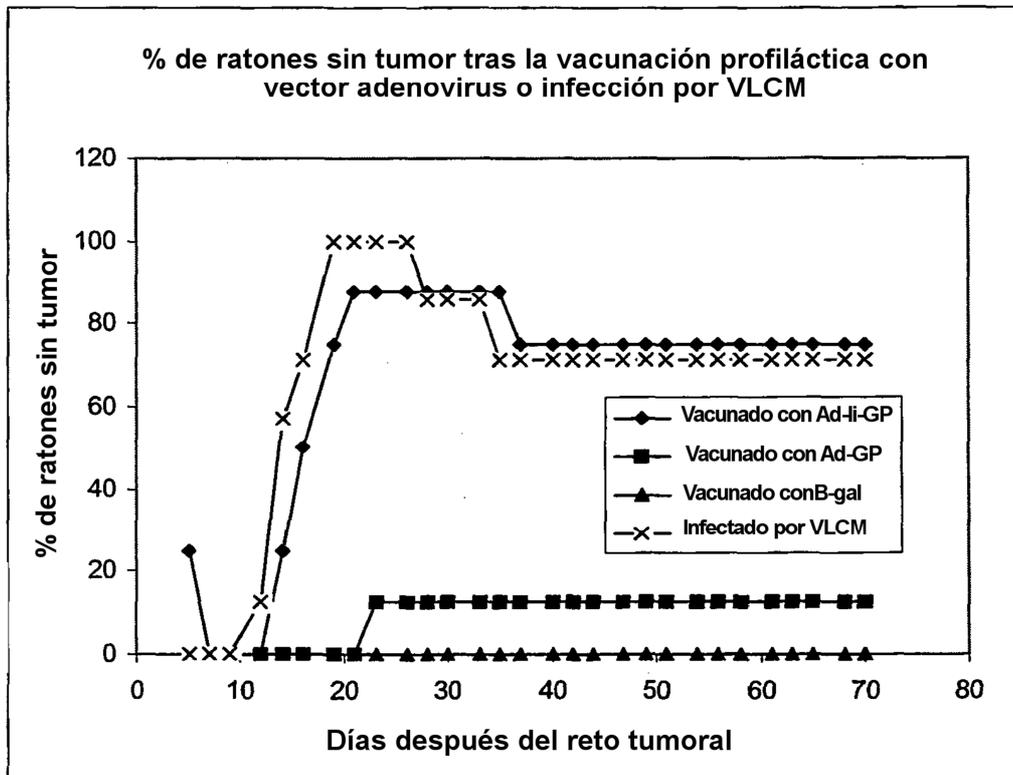


Fig. 11

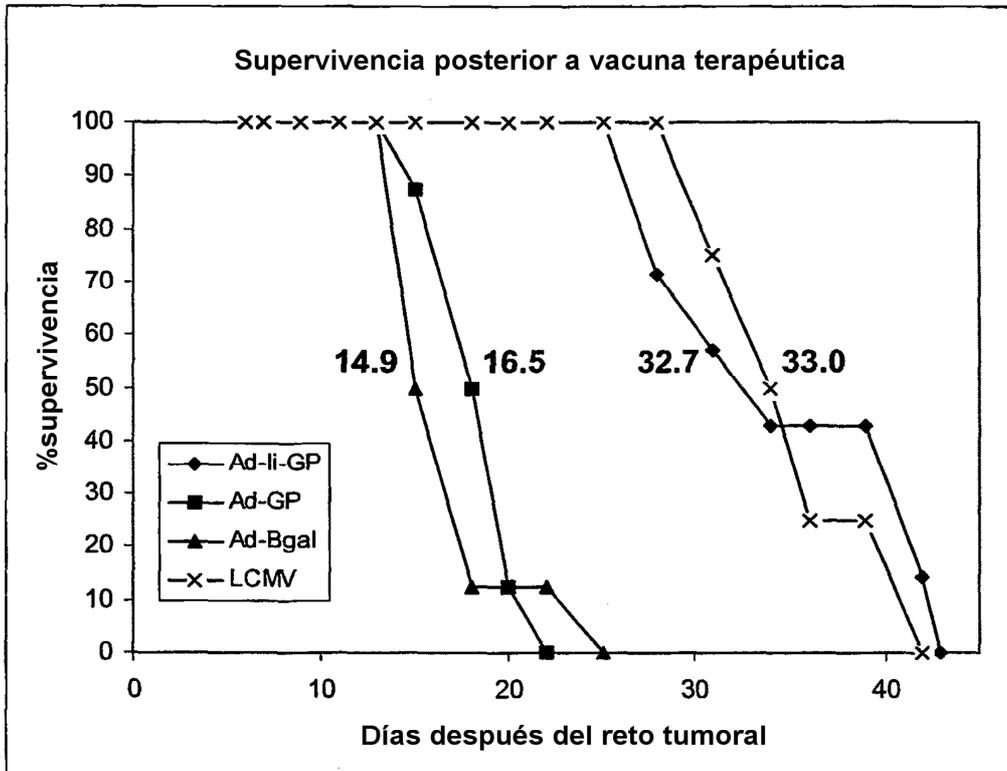


Fig. 12

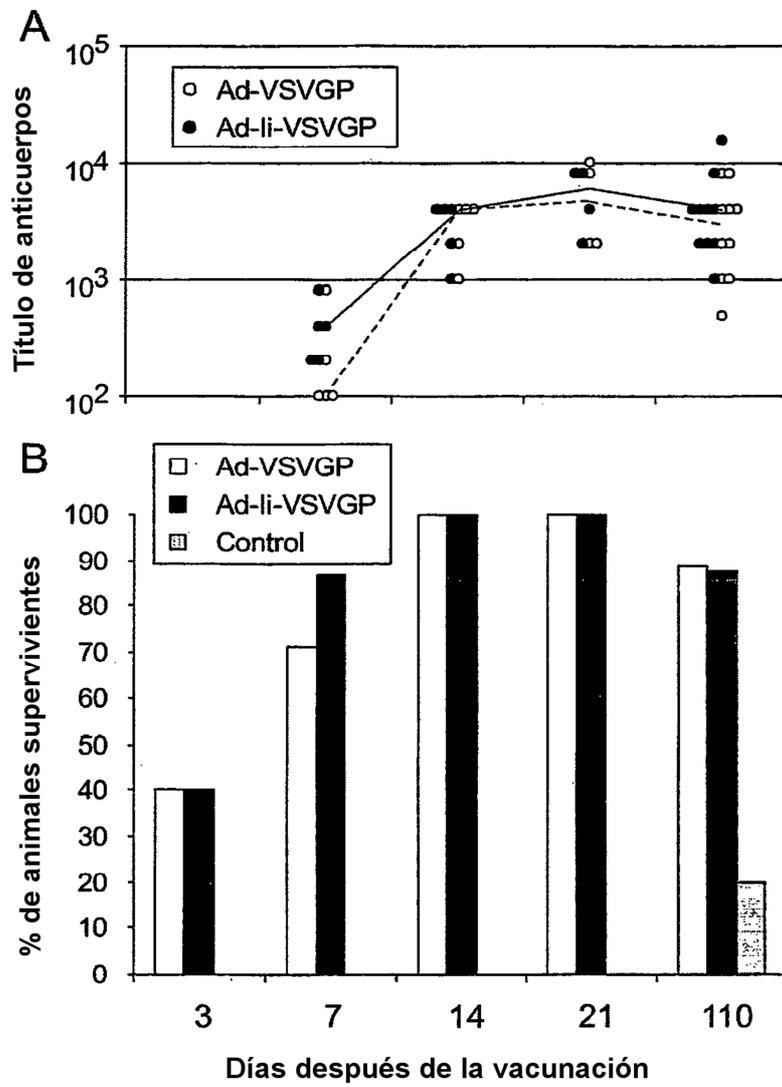


Fig. 13

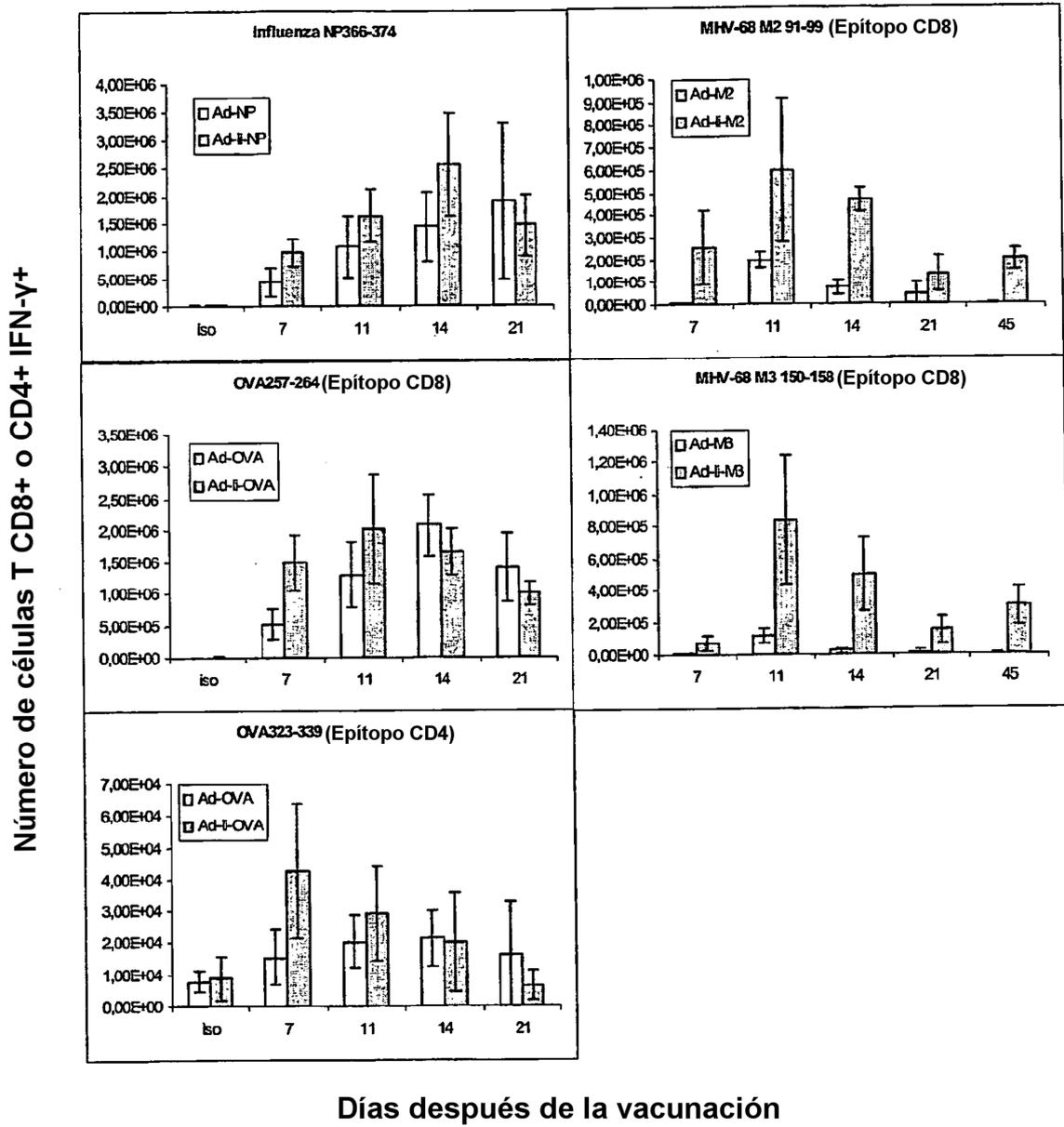


Fig.14

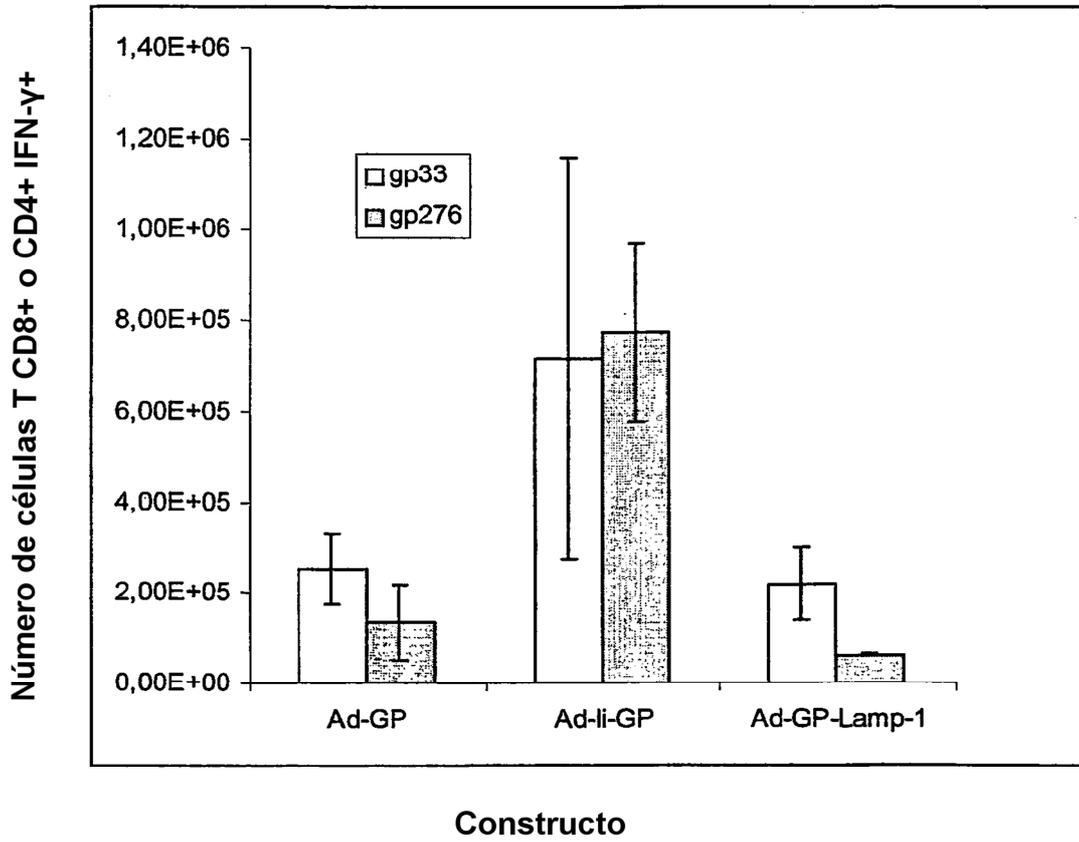


Fig. 15

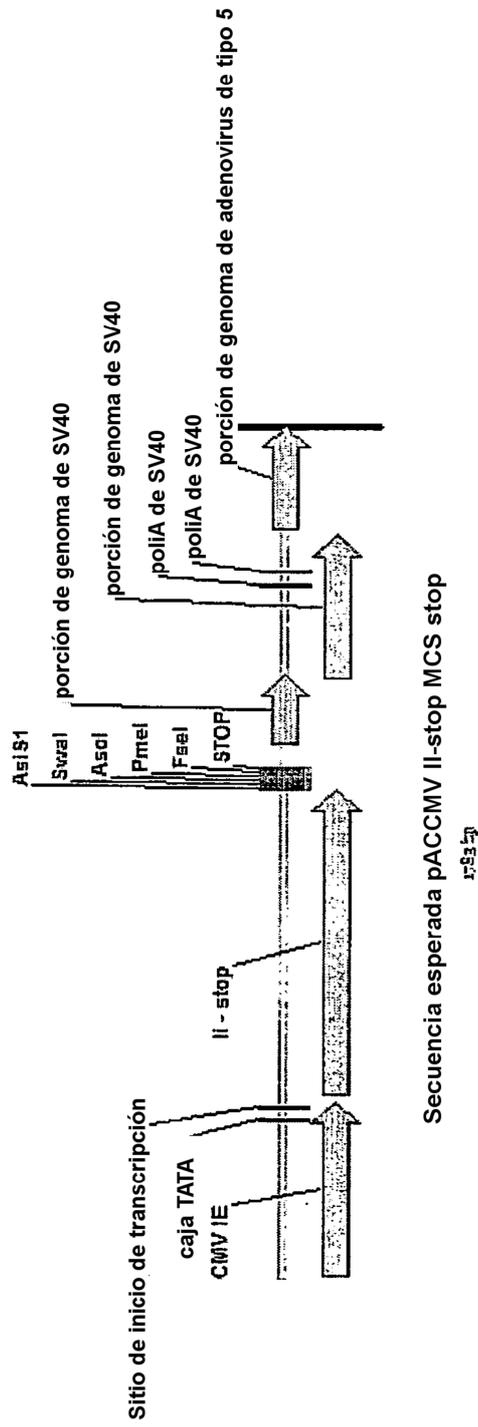


Fig. 16

