

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 715**

51 Int. Cl.:

A61K 39/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2008 E 08781241 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2170384**

54 Título: **Métodos y composiciones para la producción de un vector adenoviral para su uso en vacunaciones múltiples**

30 Prioridad:

02.07.2007 US 947601 P

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

18.07.2016

73 Titular/es:

**ETUBICS CORPORATION (100.0%)
410 West Harrison Street, Suite 100
Seattle, WA 98119, US**

72 Inventor/es:

**BALINT, JOSEPH, P.;
JONES, FRANK, R. y
GAYLE, RICHARD, B., III**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 577 715 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

Métodos y composiciones para la producción de un vector adenoviral para su uso en vacunaciones múltiples

Declaración de interés/participación gubernamental

5 La presente invención se realizó en parte con apoyo gubernamental bajo el número de Contrato 1 R43 AI071733-01 concedido por el Instituto Nacional de la Salud, el Instituto Nacional de la Alergia y Enfermedades infecciosas. El Gobierno puede tener ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes

Área técnica

10 La presente invención hace referencia a métodos para generar respuestas inmunes utilizando vectores adenovirales que permiten regímenes de múltiples vacunaciones.

Descripción del Arte relacionado

15 La dificultad más problemática con los vectores adenovirales ha sido su incapacidad para sostener la expresión de transgenes a largo plazo debido, en gran medida, a la respuesta inmune del huésped que elimina el vector adenoviral y las células transducidas viralmente en sujetos inmunocompetentes. Por tanto, el uso de vacunas con vectores adenovirales de Primera Generación está seriamente limitado por la inmunidad preexistente o inducida de las vacunas ante los adenovirus (Ad) (Yang, et al. *J Virol* 77/799-803 (2003); Casimiro, et al. *J Virol* 77/6305-6313 (2003)). Un grupo de estudio ha descrito que existe un predominio de humanos con anticuerpos contra el adenovirus de tipo 5 (Ad5), el serotipo de uso más extendido para los vectores de transferencia de genes, y que dos tercios de los humanos estudiados presentan respuestas linfo-proliferativas contra el Ad (Chirmule, et al. *Gene Ther* 6/1574-1583 (1999)). En otro estudio, una vacuna de vectores adenovirales que portaba un gen de la envoltura del VIH-1, no fue capaz de re-inmunizar una respuesta inmune que fue inducida utilizando ADN no adyuvante (Barouch, et al. *J. Virol* 77/8729-8735 (2003)). Otro grupo describió que primates no humanos con inmunidad preexistente contra el Ad5 debido a una única inmunización con Ad5, no fueron capaces de generar anticuerpos específicos de transgenes para las proteínas del VIH, además de alterar el conjunto de respuestas de los linfocitos T (McCoy, et al. *J Virol* 81/6594-6604 (2007)). En Barouch y Nabel, *Human Gene Therapy* 2005, 16:149-156 se revisan las vacunas basadas en vectores de adenovirus para el VIH-1, y se describe el progreso en el desarrollo de dichos vectores.

20 Existen numerosos mecanismos mediante los cuales la inmunidad preexistente interfiere con las vacunas de vectores adenovirales, sin embargo, el más simple consiste en la presencia de un anticuerpo neutralizante, seguido de la eliminación por respuesta inmune mediada por células de las células que portan el antígeno infectado por el Ad. Ambas respuestas están dirigidas a diversas proteínas de Ad. Se han propuesto diversas aproximaciones para superar la barrera de la inmunidad preexistente anti-vector. Quizás el enfoque más directo sería aumentar la dosis de la vacuna vectorial. Aunque existe evidencia de que aumentar las dosis de la vacuna puede incrementar la inducción de las respuestas inmunes deseadas mediadas por células (CMI) en animales inmunes al Ad (Barouch, et al. *J. Virol* 77/8729-8735 (2003)), a menudo genera efectos adversos inaceptables en animales y en humanos. En consecuencia, la mayoría de los investigadores que utilizan vacunas de vectores Ad5 de Primera Generación, utilizan el enfoque de un régimen de inducción-refuerzo heterólogo, utilizando ADN desnudo (sin vectores) como la vacuna de inducción, seguido de inmunización con un vector Ad5. Este protocolo también da como resultado una respuesta inmune posterior con el Ad5, de tal forma que no se puede administrar una re-inmunización (un refuerzo) con una misma (o diferente) vacuna de vector adenoviral que utilice la misma cadena principal vírica. Por lo tanto, con la actual Primera Generación de vectores Ad5, utilizar esta aproximación también invalida cualquier uso adicional de inmunización con vector Ad5 en el sujeto vacunado inmunizado con Ad5.

25 Las vacunas de vectores de adenovirus de Primera generación (E1 eliminado) expresan genes tardíos de Ad, aunque a nivel inferior y durante un periodo de tiempo mayor que el Adenovirus de tipo silvestre (Nevins, et al. *Cell* 26/213-220 (1981); Gaynor, et al. *Cell* 33/683-693 (1983); Yang, et al. *J Virol* 70/7209-7212 (1996)). Cuando se utilizan vectores de adenovirus de Primera Generación para la inmunización, los antígenos de las vacunas son presentados al sistema inmune simultáneamente con proteínas de la cápside del Ad sumamente inmunogénicas. El principal problema con estos vectores de adenovirus es que es menos probable que las respuestas inmunes generadas sean dirigidas a los epítomos deseados de la vacuna (McMichael, et al. *Nat Rev Immunol* 2/283-291 (2002)) y más probable que sean dirigidas a los antígenos obtenidos del adenovirus, es decir, la competición antigénica. Existe controversia acerca del mecanismo por el cual los vectores de adenovirus de la Primera Generación son potentes inmunógenos. Se ha establecido la hipótesis de que la composición de la cápside del Ad o un efecto tóxico de los genes virales crea una inflamación generalizada que da como resultado un efecto inmunoestimulador no específico. Las proteínas E1 del Ad actúan para inhibir la inflamación que sigue a la infección (Schaack, et al. *PNAS* 101/3124-3129 (2004)). La eliminación de los segmentos génicos para estas proteínas, que

5 es el caso de los vectores de adenovirus de Primera Generación, ofrece como resultado un incremento de los niveles de inflamación (Schaack, et al. PNAS 101/3124-3129 (2004); Schaack, et al. Viral Immunol 18/79-88 (2005)). Se ha descrito que los vectores de adenovirus infectan de forma eficaz las células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés), tales como células dendríticas, y que vectores virales menos inmunogénicos no lo hacen (Jooss, et al. J Virol 72/4212-4223 (1998)). Las células presentadoras de antígenos (APC), son responsables de la iniciación de respuestas CMI (Kirk, et al. Hum Gene Ther 11/797-806 (2000)). Se ha descrito que la prevención de la expresión de genes en las células dendríticas reduce enormemente la intensidad de la respuesta CMI (Hartigan-O'Connor, et al. Mol Ther 4/525-533 (2001)).

10 Por tanto, resulta evidente a partir de estos hechos que continua existiendo una necesidad para un candidato de vector de vacuna efectivo. En particular, continúa existiendo la necesidad en el arte de vectores de Ad de vacuna que permitan múltiples vacunaciones y vacunaciones en individuos con una inmunidad preexistente al Ad. Además, no existe un vector homólogo de administración de la vacuna que pueda ser empleado en un protocolo de reinmunización por inducción para la vacunación. La presente invención proporciona esta y otra ventajas.

Breve resumen

15 Un aspecto de la invención proporciona un vector de adenovirus defectuoso en replicación, en donde la región E1 se elimina, y se eliminan el gen de la ADN polimerasa y la proteína preterminal (pTP) de la región E2b, en donde el vector adenoviral defectuoso para la replicación no es un vector vacío (del inglés "guttled", desprovisto de las regiones virales de codificación), y en donde el vector adenoviral comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno diana, para su uso en un método de tratamiento del cáncer o de una enfermedad infecciosa, o de
20 vacunación contra el cáncer o contra una enfermedad infecciosa en un sujeto generando una respuesta inmune en dicho sujeto contra el antígeno diana expresado por el vector adenoviral defectuoso para la replicación en el sujeto, en donde el método comprende

(i) administrar el vector adenoviral al sujeto; y

(ii) re-administrar el vector adenoviral al sujeto,

25 para generar una respuesta inmune contra el antígeno diana.

En una realización, el antígeno diana comprende una proteína del VIH, una proteína del virus herpes simple, una proteína del virus de la hepatitis C, una proteína de la malaria, una proteína de la peste, proteína de la M. tuberculosis, o una proteína de la neumonía por Estreptococos, o un fragmento inmunogénico de la misma. En determinadas realizaciones, la proteína del VIH es una proteína gag del VIH. En una realización adicional, el
30 antígeno diana comprende un antígeno obtenido a partir de una proteína del virus de encefalitis equina venezolana (VEEV), virus de encefalitis equina occidental, o del virus de encefalitis japonesa. En aún realizaciones adicionales, el antígeno diana comprende una proteína de Leishmania, una proteína del cáncer tal como el antígeno carcinoembrionario, Her2Nu, o WT-1.

En una realización, el antígeno diana comprende un antígeno obtenido a partir de una proteína del virus de la gripe. A este respecto, la proteína de la gripe puede ser obtenida a partir del virus de la gripe H5N1. En una realización
35 adicional, la proteína del virus de la gripe puede obtenerse a partir de cualquier virus de la gripe, incluyendo pero sin limitarse a el virus H3N2, H9N1, H1N1, H2N2, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, o H10N7. En determinadas realizaciones, la proteína del virus de la gripe puede ser cualquier proteína de la gripe, incluyendo pero sin limitarse a la hemaglutinina, neuraminidasa, o la proteína matriz M1.

40 En una realización el individuo posee inmunidad preexistente al adenovirus.

En determinadas realizaciones que se proporcionan en la presente patente, el antígeno diana comprende una proteína del cáncer (*por ejemplo*, un antígeno Her2/neu) o una proteína carcinoembrionaria. En otras realizaciones, el antígeno diana comprende un antígeno bacteriano, un antígeno vírico, un antígeno obtenido a partir de una
45 proteína protozoaria, un antígeno obtenido a partir de una proteína fúngica, un antígeno obtenido a partir de una proteína molde, un antígeno obtenido a partir de una proteína de mamíferos, o un antígeno obtenido a partir de una proteína aviar.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los niveles de anticuerpos de ratones inmunizados con Ad5Null. Los
50 ratones fueron inmunizados tres veces con partículas virales de Ad5Null en intervalos de 14 días. Es de señalar la presencia de un incremento en los niveles de anticuerpos anti-Ad tras cada inmunización.

La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra los niveles de anticuerpos neutralizantes de ratones inmunizados con Ad5Null. Los ratones fueron inmunizados tres veces con partículas virales de Ad5Null en intervalos de 14 días. Es de señalar la presencia de un incremento de anticuerpos neutralizantes tras cada inmunización. Las lecturas de la densidad óptica indican la presencia de células diana viables.

5 La Figura 3 muestra los niveles medidos de anticuerpos en ratones inmunizados. Se inyectó en tres ocasiones a los ratones un vector adenoviral con delección de E2b que contenía el gen gag del VIH. Es de señalar la presencia de niveles significativamente elevados ($P < 0,05$) del anticuerpo Gag IgG en los ratones del experimento en comparación con los ratones de control normales. Las barras horizontales representan el valor medio.

10 La Figura 4 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos en el tiempo en ratones inmunizados con dos vectores adenovirales diferentes con delección de E2b, cada uno con un antígeno diana diferente. Los ratones fueron inmunizados en tres ocasiones con un vector adenoviral con delección de E2b que contenía el gen gag del VIH en intervalos de 14 días. Cuatro semanas más tarde, el mismo grupo de ratones fue inmunizado dos veces más en intervalos de 14 días, con un vector adenoviral con delección de E2b que contenía el gen de la β -galactosidasa de *Escherichia coli*. Es de señalar la presencia de un incremento en los niveles de anticuerpos IgG Gag-VIH después de múltiples inmunizaciones, en comparación con los niveles previos a la inmunización. Más aún, es de señalar la presencia de un incremento en los niveles de anticuerpos IgG de la β -galactosidasa después de dos inyecciones en el mismo grupo de ratones en comparación a los niveles previos a la inmunización.

20 La Figura 5A y Figura 5B son gráficos de barras que muestran los números de linfocitos T que expresan IFN- γ e IL-2, respectivamente. Los ratones fueron inmunizados tres veces con un vector adenoviral con delección de E2b que contenía el gen gag-VIH en intervalos de 14 días. Cuatro semanas más tarde, el mismo grupo de ratones fue inmunizado dos veces más en intervalos de 14 días, con un vector adenoviral con delección de E2b que contenía el gen de la β -galactosidasa. Para evaluar las respuestas inmunes mediadas por células, se realizaron ensayos ELISPOT para determinar el número de células secretoras de interferón- γ (IFN- γ) o interleucina-2 (IL-2), seguido de estimulación con la proteína Gag-VIH, β -galactosidasa, o virus Ad5Null. Los datos se expresan como el número de células formadoras de puntos o "spots" (SFC, por sus siglas en inglés) por 10^6 esplenocitos. Es de señalar el número de células productoras de IFN- γ e IL-2 después de que los esplenocitos fueran estimulados.

25 La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra los títulos de anticuerpos (NAb) neutralizantes de Ad5 en primates no humanos (PNH) durante el protocolo de vacunación que utiliza Ad5 [E1-,E2b-]-gag. Se inyectó a tres PNH con una única dosis de 10^{10} PV de Ad5 de tipo silvestre viable. Se midió el Ad5 NAb 30 días después de la administración y los títulos de los PNH fueron $\geq 1:50$. Los PNH inmunes a Ad5 fueron a continuación inmunizados tres veces en los días 0, 27, y 58 con Ad5 [E1-, E2b-]-gag (10^{10} PV/dosis). Es de señalar el incremento en los niveles de NAb inducido durante la vacunación con Ad5 [E1-, E2b-]-gag. Las barras verticales indican el Error Estándar de la media (EEM).

35 La Figura 7A y la Figura 7B son gráficos de barras que muestran el número de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) en macacos cynomolgus inmunes a Ad5 que secretan IFN- γ e IL-2, respectivamente. Las PBMC de individuos PNH se recogieron y las respuestas inmunes mediadas por células (CMI) se evaluaron 32 días (Día 90) después de la inmunización final con Ad5 [E1-,E2b-]-gag. Es de señalar los niveles significativamente elevados ($P < 0,05$) de células secretoras de IFN- γ (Figura 7A) e IL-2 (Figura 7B) de la muestra de PBMC tomada después del protocolo de vacunación en comparación con una línea de referencia simple (Día 8) tomada antes de las vacunaciones. Los datos del ensayo ELISpot se expresan como el número de células formadoras de manchas (SFC) por 10^6 PBMC. Las barras verticales indican el EEM.

Descripción detallada

45 La presente invención hace referencia a los vectores adenovirales para su uso en la generación de respuestas inmunes contra antígenos diana. La presente revelación proporciona una vacuna basada en Ad mejorada, de tal manera que pueden lograrse múltiples vacunaciones contra más de una entidad diana antigénica. Lo que es más importante, la vacunación puede realizarse en presencia de inmunidad preexistente al Ad y/o administrarse a sujetos inmunizados previamente en múltiples ocasiones con el vector adenoviral para su uso en la presente invención o con otros vectores adenovirales. Los vectores adenovirales para su uso en la invención pueden ser administrados a sujetos en múltiples ocasiones para inducir una respuesta inmune contra un antígeno de interés, incluyendo pero sin limitarse a, la producción de anticuerpos y las respuestas inmunes contra uno o más antígenos diana.

50 Para facilitar la comprensión de la presente invención, se definen a continuación una serie de términos y expresiones.

El término "adenovirus" o "Ad" hace referencia a un grupo de virus de ADN sin envoltura de la familia *Adenoviridae*. Además de en huéspedes humanos, estos virus pueden encontrarse en, pero sin limitarse a las mismas, las especies aviar, bovina, porcina y canina. La presente invención contempla el uso de cualquier adenovirus de

cualquiera de los cuatro géneros de la familia *Adenoviridae* (por ejemplo, *Aviadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Atadenovirus* y *Siadenovirus*) como base de un vector vírico con delección de E2b, o un vector que contiene otras delecciones según se describe en la presente patente. Además, se encuentran diversos serotipos en cada especie. El Ad también pertenece a los derivados genéticos de cualquiera de estos serotipos virales, incluyendo, pero sin limitarse a, mutaciones, delecciones o transposiciones genéticas de secuencias de ADN homólogas o heterólogas.

Un "adenovirus auxiliar" o "virus auxiliar" hace referencia a un Ad que puede proporcionar funciones virales que una célula hospedadora en particular no puede ofrecer (el huésped puede proporcionar productos génicos del Ad tales como las proteínas E1). Este virus se utiliza para proporcionar, en trans, funciones (por ejemplo, proteínas) que faltan en un segundo virus, o un virus dependiente de un virus auxiliar (por ejemplo, un virus vacío ("guttet" o "gutless"), o un virus eliminado para una región tal como la E2b u otra región, según se describe en la presente patente); se dice que el primer virus incompetente para replicación "ayuda" al segundo virus dependiente del auxiliar, permitiendo de ese modo la producción del segundo genoma viral en una célula.

El término "Adenovirus5 null (Ad5null)", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un Ad no replicante que no contiene ninguna secuencia de ácido nucleico heterólogo para la expresión.

El término "adenovirus de Primera Generación", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un Ad que presenta la delección de una región temprana 1 (E1). En casos adicionales, la región temprana 3 (E3) no esencial puede también eliminarse.

El término vacío (equivalente a "guttet" o "gutless" del inglés), tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un vector adenoviral que presenta la delección de todas sus regiones de codificación virales.

El término "transfección" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a la introducción de ácido nucleico extraño en células eucariotas. La transfección puede lograrse mediante una variedad de medios conocidos en el arte, incluyendo la co-precipitación de fosfato de calcio-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por Polybrene, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, por infección retroviral, y biolística.

El término "transfección estable" o "transfectado de forma estable" hace referencia a la introducción e integración de ácido nucleico, ADN o ARN extraño, en el genoma de la célula transfectada. El término "transfectante estable" hace referencia a una célula que ha integrado de forma estable ADN extraño en el ADN genómico.

El término "gen indicador" indica una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula indicadora (incluyendo una enzima). Una "molécula indicadora" es detectable en cualquiera de una variedad de sistemas de detección, incluyendo, pero sin limitarse a los mismos, ensayos de detección basados en enzimas (por ejemplo, ELISA, además de ensayos histoquímicos basados en enzimas), sistemas fluorescentes, radiactivos, y luminiscentes. En una realización, la presente invención contempla el gen de la β -galactosidasa de la *E. coli* (disponible de Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), proteína verde fluorescente (GFP) (comercialmente disponible de Clontech, Palo Alto, Calif.), el gen de la fosfatasa alcalina de placenta humana, el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT); otros genes indicadores son conocidos en el arte y pueden ser empleados.

Tal como se utiliza en la presente patente, los términos "codificación de molécula de ácido nucleico", "codificación de secuencia de ADN", y "codificación de ADN" hacen referencia al orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una cadena de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteína). La secuencia de ácidos nucleicos por tanto codifica la secuencia de aminoácidos.

El término "secuencia de ácido nucleico heteróloga", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una secuencia de nucleótidos que está ligada a, o se manipula para que se ligue a, una secuencia de ácidos nucleicos a la que no está ligada en la naturaleza, o a la que se liga en una localización diferente en la naturaleza. Un ácido nucleico heterólogo puede incluir una secuencia de nucleótidos que se encuentra de forma natural en la célula en la que se introduce, o el ácido nucleico heterólogo puede contener alguna modificación en relación la secuencia de origen natural.

El término "transgén" hace referencia a cualquier región de codificación de genes, ya sea secuencias de ácidos nucleicos naturales o heterólogas o secuencias de ácidos nucleicos homólogas o heterólogas fusionadas, introducidas en las células o en el genoma de un sujeto de ensayo. En la actual invención, los transgenes son transportados en un vector viral que se utiliza para introducir los transgenes a las células del sujeto.

El término "Adenovirus de Segunda Generación", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un Ad que tiene todas o parte de las secuencias génicas de ADN de E1, E2, E3, y, en ciertas realizaciones, con delecciones de E4 (eliminadas) del virus.

El término "sujeto", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a cualquier animal, *por ejemplo*, un mamífero o marsupial. Los sujetos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, humanos, primates no humanos (*por ejemplo*, Rhesus u otros tipos de macacos), ratones, cerdos, caballos, burros, vacas, ovejas, ratas y aves de todo tipo.

5 Vectores adenovirales

En comparación con los vectores adenovirales de Primera Generación, los vectores adenovirales con delección de Eb2 de Segunda Generación para su uso en la presente invención contienen delecciones adicionales en el gen (pol) de la ADN polimerasa, y delecciones de la proteína preterminal (pTP). Los vectores con delección de E2b tienen hasta una capacidad para portar genes de 13 kb, en comparación a la capacidad de 5 a 6 kb de los vectores adenovirales de Primera Generación, lo que proporciona fácilmente espacio para las secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de una variedad de antígenos diana, incluyendo, por ejemplo, los genes Gag, Pol y Nef del VIH (Amalfitano, et al. *Curr Gene Ther* 2/111-133 (2002)). Los vectores adenovirales con delección de E2b también presentan reacciones adversas reducidas en comparación con los vectores adenovirales de Primera Generación (Morrall, et al. *Hum Gene Ther* 9/2709-2716 (1998); Hodges, et al. *J Gene Med* 2/250-259 (2000); DelloRusso, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 99/12979-12984 (2002); Reddy, et al. *Mol Ther* 5/63-73 (2002); (Amalfitano and Parks, et al. *Curr Gene Ther* 2/111-133 (2002); Amalfitano *Curr Opin Mol Ther* 5/362-366 (2003); Everett, et al. *Human Gene Ther* 14/1715-1726 (2003)) Los vectores con delección de E2b presentan una expresión reducida de los genes virales (Hodges, et al. *J Gene Med* 2/250-259 (2000); Amalfitano, et al. *J Virol* 72/926-933 (1998); Hartigan-O'Connor, et al. *Mol Ther* 4/525-533 (2001)), y se ha descrito que su característica conduce a una expresión ampliada de transgenes *in vivo* (Hu, et al. *Hum Gene Ther* 10/355-364 (1999); DelloRusso, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 99/12979-12984 (2002); Reddy, et al. *Mol Ther* 5/63-73 (2002); (Amalfitano and Parks, et al. *Curr Gene Ther* 2/111-133 (2002); Amalfitano *Curr Opin Mol Ther* 5/362-366 (2003); Everett, et al. *Human Gene Ther* 14/1715-1726 (2003)).

La respuesta inmune al Ad de tipo silvestre puede ser compleja y parece que las proteínas de Ad expresadas a partir de vectores adenovirales juegan una función importante (Moorhead, et al. *J Virol* 73/1046-1053 (1999); Nazir, et al. *J Investig Med* 53/292-304 (2005); Schaack, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 101/3124-3129 (2004); Schaack, et al. *Viral Immunol* 18/79-88 (2005); Kiang, et al. *Mol Ther* 14/588-598 (2006); Hartman, et al. *J Virol* 81/1796-1812 (2007); Hartman, et al. *Virology* 358/357-372 (2007)). Específicamente, las delecciones de la proteína preterminal y de la ADN polimerasa en los vectores con delección de E2b parecen reducir la inflamación durante las primeras 24 a 72 horas a continuación de la inyección, mientras que los vectores adenovirales de Primera Generación estimulan la inflamación durante este periodo (Schaack, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 101/3124-3129 (2004); Schaack, et al. *Viral Immunol* 18/79-88 (2005); Kiang, et al. *Mol Ther* 14/588-598 (2006); Hartman, et al. *J Virol* 81/1796-1812 (2007); Hartman, et al. *Virology* 358/357-372 (2007)). Además, se ha descrito que el bloque de replicación adicional creado por la delección de E2b también conduce a una reducción de 10.000 veces en la expresión de genes tardíos de Ad, mucho más que la proporcionada por las únicas delecciones de E1, E3 (Amalfitano et al. *J. Virol.* 72/926-933 (1998); Hodges et al. *J. Gene Med.* 2/250-259 (2000)). La disminución de los niveles de proteínas de Ad producidas por los vectores con delección de E2b reduce, de forma efectiva, el potencial para respuestas inmunes competitivas, no deseadas, a los antígenos del Ad, respuestas que evitan el uso repetido de la plataforma en individuos inmunizados ante o expuestos al Ad. La inducción reducida de la respuesta inflamatoria por parte de los vectores con delección de E2b de Segunda Generación da como resultado un aumento del potencial para que los vectores expresen antígenos de la vacuna deseados durante la infección de la células presentadoras de antígeno (es decir, células dendríticas), disminuyendo el potencial para la competición antigénica, lo que da como resultado una mayor inmunización de la vacuna para el antígeno deseado en relación a intentos idénticos con vectores adenovirales de Primera Generación. Los vectores adenovirales con delección de E2b proporcionan un candidato a vacuna basado en Ad mejorado que es más seguro, más efectivo, y más versátil que los candidatos a vacuna descritos previamente.

Por tanto, la presente invención contempla el uso de vectores adenovirales con delección de E2b, tales como los descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,063,622; 6,451,596; 6,057,158; y 6,083,750. Como se describe en la patente '622, para inhabilitar aún más la expresión de proteínas virales, y también para disminuir la frecuencia de la generación de un Ad competente de replicación (RCA), la presente invención proporciona vectores adenovirales que contienen delecciones en la región E2b. La propagación de estos vectores adenovirales con delección de E2b requiere líneas celulares que expresen los productos del gen E2b eliminado. La presente invención además proporciona dichas líneas celulares de empaquetamiento; por ejemplo E.C7 (denominada formalmente C-7), obtenida a partir de la línea celular HEK-203 (Amalfitano, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 93/3352-3356 (1996); Amalfitano, et al. *Gene Ther* 4/258-263 (1997)).

Además, los productos génicos de E2b, la ADN polimerasa y la proteína preterminal, pueden ser expresados de manera constitutiva en E.C7, o células similares junto con los productos génicos de E1. La transferencia de segmentos génicos del genoma del Ad a la línea celular de producción tiene efectos inmediatos: (1) aumento de la capacidad portadora del vector adenoviral con delección de la ADN polimerasa recombinante y la proteína preterminal, ya que las secuencias de codificación combinadas de la ADN polimerasa recombinante y la proteína preterminal que pueden ser teóricamente eliminadas se aproximan a 4,6 kb; y, (2) una disminución en el potencial de generación de RCA, ya que dos o más eventos de recombinación independientes se requerirían para generar RCA.

Por tanto, el E1, la ADN polimerasa del Ad y la proteína preterminal que expresa líneas celulares utilizadas en la presente invención permiten la propagación de vectores adenovirales con una capacidad portadora que se acerca a los 13 kb, sin la necesidad de un virus auxiliar contaminante [Mitani et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3854; Hodges, et al., 2000 J Gene Med 2:250-259; (Amalfitano and Parks, Curr Gene Ther 2/111-133 (2002)]. Además, cuando genes de vital importancia para el ciclo de vida vírico se eliminan (*por ejemplo*, los genes E2b), tiene lugar una inhabilitación adicional del Ad para replicar o expresar otras proteínas de genes virales. Esto disminuirá el reconocimiento inmune de las células infectadas con virus, y permite duraciones ampliadas de la expresión de transgenes.

La característica más importante de los vectores con delección de E1, ADN polimerasa, y proteína preterminal, sin embargo, es su incapacidad para expresar las proteínas respectivas de las regiones E1 y E2b, además de una carencia prevista de la expresión de la mayoría de las proteínas estructurales virales. Por ejemplo, el promotor tardío principal (MLP, por sus siglas en inglés) de Ad es responsable de la transcripción de las proteínas estructurales tardías de la L1 a la L5 [Doerfler, en Adenovirus DNA, The Viral Genome and Its Expression (Martinus Nijhoff Publishing Boston, 1986)]. Aunque el MLP es mínimamente activo antes de la replicación del genoma del Ad, los genes tardíos del Ad altamente tóxicos se transcriben y traducen principalmente a partir del MLP únicamente después de que haya ocurrido la replicación del genoma viral [Thomas and Mathews (1980) Cell 22:523]. La activación dependiente de cis de la transcripción de genes tardíos es una característica de los ADN virus en general, tal como en el crecimiento del poliovirus y el SV-40. La ADN polimerasa y las proteínas preterminales son absolutamente necesarias para la replicación del Ad (a diferencia de las proteínas E4 o la proteína IX), y por tanto su delección es extremadamente perjudicial para la expresión de genes tardíos del vector adenoviral, y los efectos tóxicos de dicha expresión en células tales como las APC.

En ciertas realizaciones, los vectores adenovirales contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores adenovirales con delección de E2b, que presentan una delección en la región E2b del genoma del Ad y de la región E1, pero no presentan ninguna delección de otras regiones del genoma del Ad. En otra realización, los vectores adenovirales contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores adenovirales con delección de E2, que presentan una delección en la región E2b del genoma del Ad y delecciones en las regiones E1 y E3, pero ninguna otra región eliminada. En una realización adicional, los vectores adenovirales contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores adenovirales que presentan una delección en la región E2b del genoma del Ad y delecciones en las regiones E1, E3 y la eliminación completa o parcial de las regiones E4 pero ninguna otra delección. En otra realización, los vectores adenovirales contemplados para su uso en la presente invención incluyen vectores adenovirales que presentan una delección en la región E2b del genoma del Ad y delecciones en las regiones E1 y E4 pero ninguna otra delección. En otra realización, los vectores adenovirales para su uso en la presente patente presentan delecciones de las funciones de la E1, la ADN polimerasa y la proteína preterminal, y ninguna otra delección. Los vectores adenovirales contemplados para su uso en la presente patente se eliminan para al menos una parte de la región E2b y la región E1, pero no son vectores adenovirales vacíos ("guttled"). A este respecto, los vectores tienen delección de las funciones tanto de la ADN polimerasa como de la proteína preterminal de la región E2b. En una realización adicional, los vectores adenovirales para su uso en la presente invención incluyen vectores adenovirales que presentan una delección en las regiones E1, E2b y 100K del genoma del adenovirus. En una realización, los vectores adenovirales para su uso en la presente invención comprenden vectores que presentan delección de las funciones de la E1, E2b y proteasa pero ninguna otra delección. En una realización adicional, los vectores adenovirales para su uso en la presente patente presentan delección de las regiones E1 y E2b, mientras que los genes de la fibra han sido modificados por mutación u otras modificaciones (por ejemplo, para modificar el tropismo del Ad). La eliminación de los genes de las regiones E3 o E4 puede añadirse a cualquiera de los vectores adenovirales mencionados. En determinadas realizaciones, el vector adenoviral puede ser un vector adenoviral vacío o "guttled".

El término "delección de E2b", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una secuencia de ADN específica que es mutada de tal manera que se evite la expresión y/o función de al menos un producto génico de E2b. Por tanto, en determinadas realizaciones, "delección de E2b" hace referencia a una secuencia específica de ADN que es eliminada (extraída) del genoma de un Ad. "Delección de E2b" o "que contiene una delección dentro de la región E2b" hace referencia a una delección de al menos un par de bases dentro de la región E2b del genoma del Ad. Por tanto, en determinadas realizaciones, más de un par de bases es eliminado y en realizaciones adicionales, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, o 150 pares de bases son eliminados. En otra realización, la delección es de más de 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, o 300 pares de bases dentro de la región E2b región del genoma del Ad. Una delección de la E2b puede ser una delección que evite la expresión y/o función de al menos un producto génico de E2b y por lo tanto, abarca delecciones dentro de exones que codifican partes de proteínas específicas de E2b, además de delecciones dentro de secuencias líder y promotoras. En determinadas realizaciones, una delección de E2b es una delección que evita la expresión y/o función de una de entre la ADN polimerasa y la proteína preterminal de la región E2b, o de ambas. En una realización adicional, "delección de E2b" hace referencia a una o más mutaciones puntuales en la secuencia de ADN de esta región de un genoma de Ad, de tal manera que una o más proteínas codificadas sea no funcional. Tales mutaciones incluyen residuos que son reemplazados con un residuo diferente lo que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácidos que da como resultado una proteína no funcional.

Tal como entendería un experto en el arte al leer la presente revelación, otras regiones del genoma del Ad pueden ser eliminadas. Por tanto, para ser "eliminado" en una región en particular del genoma del Ad, tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una secuencia de ADN específica que es mutada de tal manera que se evite la expresión y/o función de al menos un producto génico codificado por esa región. En determinadas realizaciones, ser "eliminado" en una región en particular hace referencia a una secuencia de ADN específica que es eliminada (extraída) del genoma del Ad, de tal manera que se evite la expresión y/o función codificada por esa región (por ejemplo, las funciones de E2b de la ADN polimerasa o la función de la proteína preterminal). "Delección" o "que contiene una delección" dentro de una región en particular hace referencia a una delección de al menos un par de bases dentro de la región del genoma del Ad. Por tanto, en determinadas realizaciones, más de un par de bases se elimina y en realizaciones adicionales, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, o 150 pares de bases se eliminan de una región en particular. En otra realización, la delección es de más de 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, o 300 pares de bases dentro de una región en particular del genoma del Ad. Estas delecciones son tales que se impide la expresión y/o la función del producto génico codificado por la región. Por tanto, las delecciones abarcan delecciones dentro de los exones que codifican partes de las proteínas además de delecciones dentro de las secuencias líder y promotoras. En una realización adicional, "con delección" en una región en particular del genoma del Ad hace referencia a una o más mutaciones puntuales en la secuencia de ADN de esta región del genoma de un Ad, de tal manera que una o más proteínas codificadas sea no funcional. Tales mutaciones incluyen residuos que son reemplazados con un residuo diferente, lo que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácidos que da como resultado una proteína no funcional.

Los vectores adenovirales eliminados para su uso en la presente invención pueden ser generados utilizando técnicas recombinantes conocidas en el arte (ver por ejemplo, Amalfitano et al., 1998 J. Virol. 72:926-933; Hodges, et al., 2000 J Gene Med 2:250-259).

Tal como reconocería un experto en el arte, los vectores adenovirales para su uso en la presente invención pueden cultivarse con éxito a títulos elevados utilizando una línea celular de empaquetamiento apropiada que exprese de forma constitutiva los productos génicos de E2b y los productos de cualquiera de los genes necesarios que puedan haberse eliminado. En determinadas realizaciones, pueden utilizarse células obtenidas de la línea HEK-293 que no sólo expresan constitutivamente las proteínas E1 y ADN polimerasa, sino también la proteína preterminal del Ad. En una realización, se utilizan células E.C7 para cultivar con éxito soluciones madre con títulos elevados de los vectores adenovirales (ver por ejemplo, Amalfitano et al., J. Virol. 1998 72:926-933; Hodges, et al. J Gene Med 2/250-259 (2000)).

Para eliminar los genes esenciales de los vectores adenovirales de auto-propagación, las proteínas codificadas por los genes establecidos como diana han de ser coexpresados en primer lugar en células HEK-293, o similares, junto con las proteínas E1. Por lo tanto, únicamente pueden utilizarse aquellas proteínas que son no tóxicas cuando son coexpresadas de forma constitutiva (o proteínas tóxicas expresadas de forma inducida). La coexpresión en las células HEK-293 de los genes E1 y E4 ha sido demostrada (utilizando promotores inducibles, no constitutivos) [Yeh et al. (1996) J. Virol. 70:559; Wang et al. (1995) Gene Therapy 2:775; y Gorziglia et al. (1996) J. Virol. 70:4173]. Los genes de E1 y la proteína IX (una proteína estructural del virión) han sido coexpresados [Caravokyri y Leppard (1995) J. Virol. 69:6627], y la coexpresión de los genes de E1, E4, y la proteína IX también ha sido descrita [Krougliak y Graham (1995) Hum. Gene Ther. 6:1575]. Los genes E1 y 100k han sido expresados con éxito en líneas celulares de transcomplementación, como lo han sido los genes E1 y la proteasa (Oualikene, et al. Hum Gene Ther 11/1341-1353 (2000); Hodges, et al. J. Virol 75/5913-5920 (2001)).

Las líneas celulares que coexpresan los productos génicos de E1 y E2b para su uso en el cultivo de títulos elevados de partículas del Ad con delección de E2b, se describen en la Patente Estadounidense N° 6,063,622. La región E2b codifica las proteínas de replicación viral que son absolutamente necesarias para la replicación del genoma del Ad [Doerfler, supra y Pronk et al. (1992) Chromosoma 102:S39-S45]. Las líneas celulares de utilidad expresan la ADN polimerasa del Ad de aproximadamente 140 kD y/o la proteína preterminal de 90 kD aproximadamente. En particular, las líneas celulares que tienen una coexpresión constitutiva de alto nivel de la E1, ADN polimerasa, y las proteínas preterminales, sin toxicidad (por ejemplo, E.C7), son deseables para su uso en la propagación del Ad para su uso en múltiples vacunaciones. Estas líneas celulares permiten la propagación de vectores adenovirales con delección de las proteínas E1, ADN polimerasa, y la proteína preterminal.

El Ad recombinante para su uso en la presente invención puede ser propagado utilizando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se infectan placas de cultivo tisular que contienen células E.C7 con soluciones madre del vector adenoviral a un MOI (del inglés "Multiplicity of infection") adecuado (por ejemplo, 5), y se incuban a 37,0°C durante 40-96 h. Las células infectadas son cosechadas, resuspendidas en 10 mM Tris-Cl (pH 8,0), y sometidas a sonicación, y el virus es purificado mediante dos sesiones de centrifugación por densidad con cloruro de cesio. En determinadas técnicas, la banda que contiene el virus es desalada en una columna Sephadex CL-6B (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), se añade sacarosa o glicerol, y se almacenan los alícuotas a -80°C. En algunas realizaciones, el virus se colocará en una solución diseñada para aumentar su estabilidad, tal como A195 (Evans, et al. J Pharm Sci 93/2458-2475 (2004)). El título de la solución se mide (por ejemplo mediante medición de la densidad óptica a 260 nm de un alícuota del virus después de la lisis con SDS). En otra realización, el ADN del

plásmido, ya sea lineal o circular, que abarca todo el vector adenoviral recombinante con delección de E2b, puede ser transfectado en células E.C7, o en células similares, e incubarse a 37,0°C hasta que se halle alguna evidencia presente de producción viral (por ejemplo, el efecto citopático). Los medios acondicionados de estas células pueden utilizarse entonces para infectar más células E.C7, o células similares, para ampliar la cantidad de virus producida, antes de la purificación. La purificación puede lograrse mediante dos sesiones de centrifugación por densidad con cloruro de cesio o mediante filtración selectiva. En determinadas realizaciones, el virus puede ser purificado mediante cromatografía en columna, utilizando productos disponibles comercialmente (por ejemplo, Adenopure de Puresyn, Inc., Malvern, PA) o columnas cromatográficas realizadas a medida.

Generalmente, el Ad recombinante para su uso en la presente invención comprende una parte suficiente del virus para asegurar que las células a ser infectadas sean expuestas a una cierta cantidad de virus. Por tanto, la presente invención proporciona una solución madre de Ad recombinante, preferiblemente una solución de Ad recombinante madre sin RCA. La preparación y análisis de soluciones madre del Ad es bien conocido en el arte. Las soluciones madre virales varían considerablemente en su título, dependiendo en gran medida del genotipo viral y del protocolo y líneas celulares utilizadas para prepararlas. Las soluciones madre de la presente invención pueden tener un título de al menos aproximadamente 10^6 , 10^7 , o 10^8 pfu/ml, y muchas soluciones madre de este tipo pueden tener títulos más elevados, tales como al menos aproximadamente 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , o 10^{12} pfu/ml. Dependiendo de la naturaleza del virus recombinante y la línea celular de empaquetamiento, es posible que una solución madre viral de la presente invención pueda tener un título de incluso aproximadamente 10^{13} partículas/ml o mayor.

Se conoce en el arte información adicional sobre los sistemas de administración virales y puede encontrarse, por ejemplo, en Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321, 1989; Flexner et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexner et al., Vaccine 8:17-21, 1990; Nos. de patente estadounidense 4,603,112, 4,769,330, y 5,017,487; WO 89/01973; Patente estadounidense N° 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., Science 252:431-434, 1991; Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502, 1993; Guzman et al., Circulation 88:2838-2848, 1993; y Guzman et al., Cir. Res. 73:1202-1207, 1993.

Ácido nucleico heterólogo

Los vectores adenovirales de la presente invención comprenden también secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos diana de interés, fragmentos o fusiones de los mismos, contra los cuales se desea generar una respuesta inmune. En algunas realizaciones, los vectores adenovirales de la presente invención comprenden secuencias de ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más proteínas, fusiones de las mismas o fragmentos de las mismas, que pueden modular la respuesta inmune. En una revelación adicional, el vector adenoviral de la presente invención codifica uno o más anticuerpos contra antígenos específicos, tales como el antígeno protector del ántrax, que permite la inmunoterapia pasiva. En determinadas realizaciones, los vectores adenovirales de la presente revelación comprenden secuencias de ácidos nucleicos heterólogos que codifican una o más proteínas con efecto terapéutico (por ejemplo, función anti-viral, anti-bacteriana, antiparasitaria, o anti-tumoral). Por tanto, la presente invención proporciona vectores adenovirales con delección de E2b de Segunda Generación que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga.

Como tal, la presente revelación además proporciona secuencias de ácidos nucleicos, también denominadas en la presente patente polinucleótidos, que codifican uno o más antígenos diana de interés. Como tal, la presente revelación proporciona polinucleótidos que codifican antígenos diana procedentes de cualquier fuente, según se describe adicionalmente en la presente patente, vectores que comprenden tales polinucleótidos y células hospedadoras transformadas o transfectadas con dichos vectores de expresión. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan esencialmente de manera intercambiable en la presente patente. Tal como será también reconocido por el experto en el arte, los polinucleótidos de la invención pueden ser de cadena única (codificante o antisentido) o de doble cadena, y puede ser ADN (genómico, ADNc o sintético) o moléculas de ARN. Las moléculas de ARN pueden incluir moléculas de ARNhn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de manera exacta, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes pueden, pero no necesitan, estar presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede, pero no necesita, estar ligado a otras moléculas y/o materiales de soporte. Un polinucleótido aislado, tal como se utiliza en la presente patente, significa que un polinucleótido se encuentra sustancialmente alejado de otras secuencias codificantes. Por ejemplo, una molécula aislada de ADN tal como se utiliza en la presente patente no contiene grandes partes de ADN codificante no relacionado, tal como grandes fragmentos cromosómicos u otros genes funcionales o regiones codificantes del polipéptido. Por supuesto, esto hace referencia a la molécula de ADN según se aisló originalmente, y no excluye genes o regiones codificantes añadidas más tarde al segmento de forma recombinante en el laboratorio.

Tal como se entenderá por los expertos en el arte, los polinucleótidos de esta revelación pueden incluir secuencias genómicas, extra-genómicas y secuencias codificadas por plásmidos y segmentos génicos modificados por ingeniería genética más pequeños que expresan, o pueden ser adaptados para expresar antígenos diana tal como

se describe en la presente patente, fragmentos de antígenos, péptidos y similares. Tales segmentos pueden ser naturalmente aislados, o modificados por la mano del hombre.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un epítipo/proteína/polipéptido antigénico diana de la invención o una parte del mismo) o puede comprender una secuencia que codifica una variante o derivado de una secuencia de este tipo. En determinadas realizaciones, las secuencias de polinucleótidos expuestas en la presente patente codifican proteínas antigénicas diana tal como se describe en la presente patente. En algunas realizaciones, los polinucleótidos representan una secuencia genética nueva que ha sido optimizada para la expresión en tipos de células específicos (es decir, líneas celulares humanas) que pueden variar sustancialmente de la secuencia de nucleótidos nativa o variante pero codifican un antígeno proteico similar.

En otras realizaciones relacionadas, la presente revelación proporciona variantes de polinucleótidos que presentan una identidad considerable con las secuencias nativas que codifican proteínas (por ejemplo, antígenos diana de interés) según se ha descrito en la presente patente, por ejemplo aquellas que comprenden al menos un 70% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o mayor identidad de secuencia, en comparación con una secuencia nativa de polinucleótidos que codifica los polipéptidos de esta revelación utilizando los métodos descritos en la presente patente, (por ejemplo, análisis BLAST utilizando parámetros estándar, tal como se describe más adelante). Un experto en el arte reconocerá que estos valores pueden ajustarse de forma apropiada para determinar la correspondiente identidad de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración del codón, similitud de aminoácidos, posicionamiento del marco de lectura y similares.

Habitualmente, las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, preferiblemente de tal manera que la inmunogenicidad del epítipo del polipéptido codificado por la variante del polinucleótido, o que la inmunogenicidad de la proteína diana heteróloga, no sea sustancialmente reducida en relación a un polipéptido codificado por la secuencia nativa de polinucleótidos. Tal como se describe en otras partes en la presente patente, las variantes de polinucleótidos preferiblemente codifican una variante del antígeno diana, o un fragmento (por ejemplo, un epítipo) del mismo, en donde la tendencia de la variante del polipéptido o fragmento (por ejemplo, epítipo) del mismo a reaccionar con antisuero específico del antígeno y/o linfocitos T o clones, no se reduce sustancialmente en relación al polipéptido nativo. Debe entenderse que el término "variantes" también abarca los genes homólogos de origen xenogénico.

La presente revelación proporciona polinucleótidos que comprenden o consisten en al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000 o más nucleótidos contiguos que codifican un polipéptido, incluyendo antígenos proteicos diana, según se describe en la presente patente, además de todas las longitudes intermedias entre los mismos. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros entre 200-500; 500-1,000, y similares. Una secuencia de polinucleótidos según se describe en la presente patente puede ampliarse a uno o ambos extremos mediante nucleótidos adicionales que no se encuentran en la secuencia nativa que codifica un polipéptido según se describe en la presente patente, tal como un epítipo o una proteína diana heteróloga. Esta secuencia adicional puede consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos o más, en cualquier extremo de la secuencia revelada o en ambos extremos de la secuencia revelada.

Los polinucleótidos de la presente revelación, o fragmentos de los mismos, independientemente de la longitud de la propia secuencia de codificación, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación de las secuencias de control de la expresión, sitios adicionales de enzimas de restricción, múltiples sitios de clonación, otros segmentos de codificación, y similares, de tal manera que su longitud total puede variar considerablemente. Se contempla, por lo tanto, que pueda ser empleado un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, donde su longitud total esté limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante deseado. Por ejemplo, se contemplan que segmentos de polinucleótidos con longitudes totales de aproximadamente 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de longitud, y similares, (incluyendo todas las longitudes intermedias) son de utilidad en muchas implementaciones de la presente revelación.

Cuando se comparan secuencias de polinucleótidos, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para determinar su máxima correspondencia, tal como se describe más adelante. Las comparaciones entre dos secuencias se llevan a cabo comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, 40

a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias sean alineadas de manera óptima.

El alineamiento óptimo de secuencias para su comparación puede ser llevado a cabo utilizando el programa Megalign en paquete Lasergene de programas de software para la bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, WI), utilizando parámetros por defecto. Este programa incorpora diversos esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, págs. 345-358; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenies, págs. 626-645 (1990); Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., CABIOS 5:151-153 (1989); Myers, E.W. y Muller W., CABIOS 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb. Theor 11:105 (1971); Saitou, N. Nei, M., Mol. Biol. Evol. 4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730 (1983).

De manera alternativa, el alineamiento óptimo de secuencias para su comparación puede ser llevado a cabo mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, Add. APL. Math 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante los métodos de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Un ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia y la similitud de la secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 (1977), y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), respectivamente. Los programas BLAST y BLAST 2.0 pueden ser utilizados, por ejemplo, con los parámetros descritos en la presente patente, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos de la invención. El software para realizar los análisis BLAST se encuentra disponible para el público a través del National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica). En un ejemplo, pueden calcularse las puntuaciones acumuladas utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación extra para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). La extensión de los "hits" (coincidencias con secuencias en la base de datos) de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación del alineamiento acumulado cae en una cantidad X desde su puntuación máxima alcanzada; la puntuación acumulada llega a cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como parámetros por defecto una longitud de palabra (W) de 11, y un valor esperado (E) de 10, y los alineamientos con la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) (B) de 50, valor esperado (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en donde la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, "gaps" o huecos) del 20 por ciento o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que las bases de ácidos nucleicos tienen lugar en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Se podrá apreciar por los expertos habituales en el arte, como resultado de la degeneración del código genético, que existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un antígeno de interés en particular, o un fragmento del mismo, según se describe en la presente patente. Algunos de estos polinucleótidos tienen una mínima homología con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, la presente invención contempla específicamente los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente invención se encuentran dentro del alcance de la presente revelación. Los alelos son genes endógenos que se modifican como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y proteína resultante pueden, pero necesitan, tener una estructura o función modificada. Los alelos pueden ser identificados utilizando técnicas estándar (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias con las bases de datos).

Por lo tanto, en otra realización de la revelación, un enfoque de mutagénesis, tal como mutagénesis dirigida, se emplea para la preparación de variantes y/o derivados de las secuencias antigénicas diana, o fragmentos de las

5 mismas, tal como se describe en la presente patente. Mediante este enfoque, pueden realizarse modificaciones específicas en una secuencia polipeptídica a través de la mutagénesis de los polinucleótidos subyacentes que las codifican. Estas técnicas proporcionan un enfoque directo para preparar y probar variantes de secuencias, por ejemplos, que incorporan una o más de las anteriores consideraciones, introduciendo uno o más cambios de la secuencia de nucleótidos en el polinucleótido.

10 La mutagénesis dirigida permite la producción de mutantes mediante el uso de secuencias específicas de oligonucleótidos que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, además de una cantidad suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar la secuencia de un cebador de suficiente tamaño y complejidad de secuencia para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de la delección que está siendo cruzada. Las mutaciones pueden emplearse en una secuencia de polinucleótidos seleccionada para mejorar, alterar, disminuir, modificar, o de otro modo cambiar las propiedades del propio polinucleótido, y/o alterar las propiedades, actividad, composición, estabilidad, o secuencia primaria del polipéptido codificado.

15 En determinadas realizaciones de la presente revelación, los inventores contemplan la mutagénesis de las secuencias de polinucleótidos reveladas para modificar una o más propiedades del polipéptido codificado, tal como la inmunogenicidad de un epítipo comprendido en un polipéptido. Los ensayos para probar la inmunogenicidad de un polipéptido o variante del mismo son bien conocidos en el arte e incluyen, pero no están limitados a, ensayos de citotoxicidad de linfocitos T (CTL/ ensayos de liberación de cromo), ensayos de proliferación de linfocitos T, tinción de citoquinas intracelulares, ELISA, ELISpot, etc. Las técnicas de mutagénesis dirigida son bien conocidas en el arte, y son ampliamente utilizadas para crear variantes de tanto polipéptidos como polinucleótidos. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida se utiliza a menudo para modificar una parte específica de una molécula de ADN. En tales realizaciones, se emplea un cebador que comprende habitualmente de 14 a aproximadamente 25 nucleótidos más o menos de longitud, con aproximadamente de 5 a aproximadamente 10 residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que está siendo modificada.

25 La preparación de las variantes de las secuencias de los segmentos de ADN seleccionados que codifican péptidos, utilizando mutagénesis dirigida proporciona un medio para producir especies potencialmente útiles y no se pretende que sea limitativo, ya que existen otras formas en las que pueden obtenerse las variantes de las secuencias peptídicas y las secuencias de ADN que las codifican. Por ejemplo, los vectores recombinantes que codifican la secuencia peptídica deseada pueden ser tratados con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencias. Se pueden encontrar detalles específicos en referencia a estos métodos y protocolos en las publicaciones de Maloy et al., 1994; Segal, 1976; Prokop y Bajpai, 1991; Kuby, 1994; y Maniatis et al., 1982.

35 Los segmentos de polinucleótidos o fragmentos que codifican los polipéptidos de la presente revelación pueden prepararse fácilmente sintetizando, por ejemplo, directamente el fragmento mediante medios químicos, tal como es práctica habitual utilizando un sintetizador automático de oligonucleótidos. También, pueden obtenerse fragmentos mediante la aplicación de tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tales como la tecnología PCR™ de la Patente estadounidense 4,683,202, introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante, y mediante otras técnicas de ADN recombinante conocidas en general por los expertos en el arte de la biología molecular (ver por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY, NY).

40 Para expresar un polipéptido antigénico diana deseado o un fragmento del mismo, una proteína de fusión que comprenda cualquiera de los anteriores, tal como se describe en la presente patente, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o los equivalentes funcionales, se insertan en un Ad apropiado, tal como se describe en otras partes de la presente invención, utilizando técnicas recombinantes conocidas en el arte. El vector adenoviral apropiado contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada y cualquier conector deseado. Pueden utilizarse métodos que son bien conocidos para los expertos en el arte para construir estos vectores adenovirales que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y la traducción adecuados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis, y recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Amalfitano et al., 1998 J. Virol. 72:926-933; Hodges, et al., 2000 J Gene Med 2:250-259; Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York. N.Y.

55 Una variedad de sistemas huésped/vector puede ser utilizada para contener y producir secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de ADN de bacteriófagos, plásmidos, o cósmidos; levadura transformada con vectores de levadura; sistemas de células de insectos (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores víricos (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector adenoviral son aquellas regiones no traducidas de potenciadores de los vectores, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas que interactúan con

5 proteínas celulares hospedadoras para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema vectorial y el huésped utilizado, puede utilizarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, las secuencias que codifican un polipéptido de interés pueden estar ligadas a un complejo de transcripción/traducción de Ad que consiste en el promotor tardío y secuencias líder tripartitas. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede utilizarse para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células hospedadoras infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659). Además, pueden utilizarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamíferos.

10 Pueden utilizarse también señales específicas de iniciación para lograr una traducción más eficaz de las secuencias que codifican un polipéptido de interés. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En casos en los que las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de iniciación, y las secuencias aguas arriba se introducen en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias ninguna señal de control de la transcripción o la traducción. Sin embargo, en casos en los que únicamente la secuencia de codificación, o una parte de la misma, sea insertada, deberían ser proporcionadas las señales exógenas de control de la traducción, incluyendo el codón de iniciación ATG. Más aún, el codón de iniciación debería estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción del inserto completo. Los elementos exógenos de traducción y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede ser mejorada por la inclusión de potenciadores que son apropiados para el sistema celular en particular que se utiliza, tal como los descritos en la literatura (Scharf, D. et al. (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162). Las secuencias de terminación específicas, ya sea para la transcripción o para la traducción, pueden además ser incorporadas para lograr una traducción eficaz de la secuencia que codifica el polipéptido de elección.

15 Son conocidos en el arte una variedad de protocolos para la detección y medición de la expresión de productos codificados por polinucleótidos (por ejemplo, antígenos diana de interés), que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Entre los ejemplos se incluyen el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación activadas por fluorescencia (FACS). Puede preferirse para algunas aplicaciones un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales de dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos no interferentes en un polipéptido dado, pero puede también emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros, en Hampton, R. et al. (1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul. Minn.) y Maddox, D. E. et al. (1983; J. Exp. Med. 158:1211-1216).

20 Los vectores adenovirales para su uso en la presente invención comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos de interés. La secuencia de ácidos nucleicos puede también contener un producto que pueda ser detectado o seleccionado. Tal como se menciona en la presente patente, un gen "indicador" es uno cuyo producto puede ser detectado, por ejemplo mediante fluorescencia, actividad enzimática en un sustrato cromogénico o fluorescente, y similar o seleccionarse por las condiciones de crecimiento. Los genes indicadores de este tipo incluyen, sin limitación, proteína verde fluorescente (GFP), β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, neomicina fosfotransferasa, fosfatasa alcalina secretada (SEAP), y la hormona del crecimiento (HGH). Los marcadores seleccionables incluyen resistencias a fármacos, tales como neomicina (G418), higromicina, y similares.

25 El ácido nucleico que codifica un antígeno de interés puede además comprender un promotor o secuencia de control de la expresión. Esta es una secuencia de ácido nucleico que controla la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno diana, y generalmente está activa o puede activarse en la célula establecida como diana. La elección del promotor dependerá en parte del tipo de célula establecida como diana, y del grado o tipo de control deseado. Los promotores que son adecuados dentro del contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, los constitutivos, específicos del tejido, específicos del tipo de célula, específicos del tiempo, o específicos del evento.

30 Ejemplos de promotores no específicos o constitutivos incluyen el promotor temprano de SV40 (Patente estadounidense N° 5,118,627), el promotor tardío de SV40 (Patente estadounidense N° 5,118,627), promotor del gen temprano de CMV (Patente estadounidense N° 5,168,062), promotor del virus del papiloma bovino, y promotor adenoviral. Además de promotores virales, los promotores celulares son también posibles dentro del contexto de esta invención. En particular, son de utilidad los promotores celulares para los denominados genes housekeeping (genes constitutivos) (por ejemplo, β -actina). Los promotores virales son generalmente promotores más fuertes que los promotores celulares.

35 También pueden utilizarse promotores inducibles. Estos promotores incluyen el promotor LTR del MMTV (PCT WO 91/13160), inducible por dexametasona, promotor de metalotioneína, inducible por metales pesados, y promotores con elementos de respuesta a AMPc, inducibles por un promotor como AMPc y el choque térmico. Al utilizar un promotor inducible, el ácido nucleico puede ser administrado a una célula y permanecerá quiescente hasta la adición del inductor. Esto permite un control adicional sobre los tiempos de producción de la proteína de interés.

Los promotores específicos tipo evento, están activos o se regulan por incremento cuando ocurre un evento, tal como la tumorigenicidad o una infección viral, por ejemplo. El promotor LTR del VIH LTR es un ejemplo bien conocido de un promotor de evento específico. El promotor está inactivo a menos que el producto génico de TAT esté presente, lo que ocurre ante una infección viral. Algunos promotores de tipo específicos de evento también son específicos del tejido. Los promotores específicos tipo evento preferidos incluyen promotores activados ante una infección viral.

Ejemplos de promotores discutidos en la presente patente incluyen, pero no se limitan a, promotores para la alfafetoproteína, alfa actina, myo D, antígeno carcinoembrionario, receptor VEGF (Nº de Acceso del GenBank X89776); receptor FGF; TEK o tie 2 (Nº de Acceso del GenBank L06139); tie (Nos. de Acceso del GenBank X60954; S89716); receptor de la uroquinasa (Nº de Acceso del GenBank S78532); selectinas E y P (Nos. de Acceso del GenBank M64485; L01874); VCAM-1 (Nº de Acceso del GenBank M92431); endogлина (Nº de Acceso del GenBank HSEND0G); endosialina (Rettig et al., PNAS 89:10832, 1992); alfa Vbeta3 integrina (Villa-Garcia et al., Blood 3:668, 1994; Donahue et al., BBA 1219:228, 1994); endotelina-1 (Nos. de Acceso del GenBank M25377; J04819; J05489); ICAM-3 (Nº de Acceso del GenBank S50015); antígeno E9 (Wang et al., Int. J. Cancer 54:363, 1993); factor de von Willebrand (Nos. de Acceso del GenBank HUMVWFI; HUMVWFA); CD44 (Nº de Acceso del GenBank HUMCD44B); CD40 (Nos. de Acceso del GenBank HACD40L; HSCD405FR); cadherina endotelial vascular (Martin-Padura et al., J. Pathol. 175:51, 1995); Notch 4 (Uyttendaele et al., Development 122:2251, 1996) como antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular; antígeno-1 específico de próstata, probasina, receptor FGF, receptor VEGF, erb B2; erb B3; erb B4; MUC-1; HSP-27; int-1; int-2, CEA, receptor HBEGF; receptor EGF; tirosinasa, MAGE, receptor de IL-2; fosfatasa ácida prostática, probasina, antígeno prostático específico de membrana, alfa-cristalino, receptor de PDGF, receptor de integrina, α -actina, cadenas pesadas de miosina SM1 y SM2, calponina-h1, receptor de la angiotensina alfa SM22, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, cadena pesada de la inmunoglobulina, cadena ligera de la inmunoglobulina, CD4, y similares son útiles en el contexto de esta invención.

Además del promotor, las secuencias represoras, reguladores negativos, o silenciadores específicos del tejido pueden ser insertados para reducir la expresión no específica del polinucleótido. Pueden insertarse múltiples elementos represores en la región promotora. La represión de la transcripción es independiente de la orientación de los elementos represores o la distancia del promotor. Un tipo de secuencia represora es una secuencia aisladora. Tales secuencias inhiben la transcripción (Dunaway et al., Mol Cell Biol 17: 182-9, 1997; Gdula et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:9378-83, 1996; Chan et al., J Virol 70: 5312-28, 1996; Scott y Geyer, EMBO J 14: 6258-67, 1995; Kalos y Fournier, Mol Cell Biol 15: 198-207, 1995; Chung et al., Cell 74: 505-14, 1993) y silenciará la transcripción de fondo.

Los elementos reguladores negativos han sido caracterizados en las regiones promotoras de un número de genes diferentes. El elemento represor funciona como un represor de la transcripción en ausencia de factores, tales como esteroides, de la misma manera que la NSE en la región promotora del gen de la ovoalbúmina (Haecker et al., Mol. Endocrinology 9:1113-1126, 1995). Estos elementos reguladores negativos se unen a complejos proteicos específicos de la trompa de Falopio, ninguno de los cuales son sensibles a los esteroides. Tres elementos diferentes están localizados en el promotor del gen de la ovoalbúmina. Los oligonucleótidos correspondientes a partes de estos elementos reprimen la transcripción viral del gen TK indicador. Uno de los elementos silenciadores comparte identidad de secuencia con silenciadores en otros genes (TCTCTCCNA).

Los elementos represores también se han identificado en la región promotora de una variedad de genes, incluyendo el gen del colágeno II, por ejemplo. Estudios de retraso en gel mostraron que los factores nucleares de células HeLa se unen específicamente a fragmentos de ADN que contienen la región silenciadora, mientras que los extractos nucleares del condrocito no mostraron ninguna actividad de unión (Savanger et al., J. Biol. Chem. 265(12):6669-6674, 1990). Se ha mostrado también que los elementos represores regulan la transcripción en el gen de la carbamoil fosfato sintetasa (Goping et al., Nucleic Acid Research 23(10):1717-1721, 1995). Este gen se expresa únicamente en dos tipos de células diferentes, hepatocitos y células epiteliales de la mucosa intestinal. Las regiones reguladoras negativas también se han identificado en la región promotora del gen de la colina acetiltransferasa, el promotor de la albúmina (Hu et al., J. Cell Growth Differ. 3(9):577-588, 1992), el gen promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK-2) (Misuno et al., Gene 119(2):293-297, 1992), y en el gen de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2, 6-bisfosfatasa, en los que el elemento regulador inhibe la transcripción en líneas celulares no hepáticas (Lemaigre et al., Mol. Cell Biol. 11 (2):1099-1106). Más aún, el elemento regulador negativo tse-1 se ha identificado en un número de genes específicos del hígado, incluyendo la tirosina aminotransferasa (TAT). La expresión de genes TAT es específica del hígado e inducible tanto por los glucocorticoides como la vía de señalización AMPc. Se ha mostrado que el elemento de respuesta a AMPc (CRE) es la diana para la represión por parte de Tse-1 y de los elementos específicos hepatocitos (Boshart et al., Cell 61(5):905-916, 1990). Por consiguiente, queda claro que son las variedades de tales elementos son conocidas o se identifican fácilmente.

En determinadas realizaciones, los elementos que aumentan la expresión del antígeno diana deseado se incorporan a la secuencia de ácidos nucleicos de los vectores adenovirales descritos en la presente patente. Tales elementos incluyen sitios internos de unión al ribosoma (IRES; Wang y Siddiqui, Curr. Top. Microbiol. Immunol 203:99, 1995; Ehrenfeld y Semler, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203:65, 1995; Rees et al., Biotechniques 20:102, 1996; Sugimoto

et al., *Biotechnology*12:694, 1994). Los IRES (sitios de entrada al ribosoma) aumentan la eficacia de la traducción. También otras secuencias pueden aumentar la expresión. Para algunos genes, las secuencias especialmente en el extremo 5' inhiben la transcripción y/o traducción. Estas secuencias son habitualmente palíndromos que pueden formar estructuras horquilla. Cualquier secuencia de este tipo en el ácido nucleico a ser administrado generalmente se elimina. Los niveles de expresión del producto transcrito o traducido se someten a ensayo para confirmar o asegurar que secuencias afectan a la expresión. Los niveles del transcrito pueden someter a ensayo mediante cualquier método conocido, incluyendo hibridación por ensayo de transferencia Northern blot, protección con sonda de RNasa y similares. Los niveles de proteína pueden ser sometidos a ensayo mediante cualquier método conocido, incluyendo ELISA.

5 Tal como reconocería el experto en el arte, los vectores adenovirales de la presente invención que comprenden secuencias de ácido nucleico heterólogo, pueden ser generados utilizando técnicas recombinantes conocidas en el arte, tales como las descritas en Maione et al., 2001 *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:5986-5991; Maione et al., 2000 *Hum Gene Ther* 11:859-868; Sandig et al. 2000 *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:1002-1007; Harui et al. 2004 *Gene Therapy*, 11:1617-1626; Parks et al., 1996 *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:13565-13570; DelloRusso et al., 2002 *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:12979-12984; *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, NY, NY).

10 Tal como se indica anteriormente, el vector adenoviral para su uso en la presente invención comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una o más proteínas o antígenos de interés. A este respecto, los vectores pueden contener ácido nucleico que codifique 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más antígenos diana diferentes de interés. Los antígenos diana pueden ser una proteína de longitud completa o puede ser un fragmento (por ejemplo, un epítipo) de la misma. Los vectores adenovirales pueden contener secuencias de ácido nucleico que codifican múltiples fragmentos o epítopos de una proteína diana de interés o puede contener uno o más fragmentos o epítopos de numerosas proteínas diana diferentes de interés.

15 El término "antígeno diana" o "proteína diana" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a una molécula, tal como una proteína, contra la cual se va a dirigir una respuesta inmune. El antígeno diana puede comprender cualquier sustancia contra la cual sea deseable generar una respuesta inmune pero, generalmente, el antígeno diana es una proteína. Un antígeno diana puede comprender una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma que induzca una respuesta inmune (es decir, un fragmento inmunogénico).

20 Un "fragmento inmunogénico" tal como se utiliza en la presente patente, es un fragmento de un polipéptido que es específicamente reconocido (es decir, específicamente enlazado) por un receptor del antígeno de superficie de linfocitos B y/o linfocitos T, lo que da como resultado la generación de una respuesta inmune específicamente contra el fragmento. En determinadas realizaciones, los fragmentos inmunogénicos se unen a una molécula del MHC de clase I o clase II. Tal como se utiliza en la presente patente, se dice que un fragmento inmunogénico se "une a" una molécula del MHC de clase I o clase II si tal unión es detectable utilizando cualquier ensayo conocido en el arte. Por ejemplo, la habilidad de un polipéptido para unirse al MHC de clase I puede ser evaluada indirectamente monitorizando la habilidad para promocionar la incorporación de ¹²⁵I de β2-microglobulina (β2m) marcada a complejos de MHC de clase I/β2m/péptido heterotrimérico (ver Parker et al., *J. Immunol.* 152:163, 1994). De forma alternativa, pueden emplearse ensayos de competición de péptidos funcionales que son conocidos en el arte. Los fragmentos inmunogénicos de polipéptidos pueden identificarse generalmente utilizando técnicas bien conocidas, tales como las que se resumen en Paul, *Fundamental Immunology*, 3^a ed., 243-247 (Raven Press, 1993) y en las referencias citadas en la misma. Las técnicas representativas para identificar fragmentos inmunogénicos incluyen el cribado de polipéptidos para determinar su habilidad para reaccionar con antisueros específicos del antígeno y/o líneas de linfocitos T o clones. Un fragmento inmunogénico de un polipéptido diana en particular es un fragmento que reacciona con dichos antisueros y/o linfocitos T a un nivel que no es sustancialmente menor que la reactividad del polipéptido diana de longitud completa (por ejemplo, en un ensayo ELISA y/o de reactividad de los linfocitos T). En otras palabras, un fragmento inmunogénico puede reaccionar dentro de tales ensayos a un nivel que es similar a o mayor que la reactividad del polipéptido de longitud completa. Tales cribados pueden realizarse generalmente utilizando métodos bien conocidos para los expertos en el arte, tales como los descritos en Harlow y Lane, en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

25 Los antígenos de utilidad en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, antígenos obtenidos de cualquiera de entre una variedad de agentes infecciosos o células cancerígenas. Tal como se utiliza en la presente patente, un "agente infeccioso" es cualquier organismo viviente capaz de infectar a un huésped, y "cáncer" significa una célula neoplásica. Los agentes infecciosos incluyen, por ejemplo, bacterias, cualquier variedad de virus, tales como, virus de ARN monocatenario, virus de ADN monocatenario, hongos, parásitos, y protozoos. Ejemplos de agentes infecciosos incluyen, pero no se limitan a, *Actinobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Adenovirus* (tipos 1, 2, 3, 4, 5 y 7), *Adenovirus* (tipos 40 y 41), *Aerococcus* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Ancylostoma duodenale*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris* spp., *Aspergillus* spp., *Babesia* spp., *B. microti*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides* spp., *Balantidium coli*, *Bartonella bacilliformis*, *Blastomyces dermatitidis*, virus de la lengua azul, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Branhamella catarrhalis*, *Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*), *Brugia* spp., *Burkholderia*, (*Pseudomonas*) *mallei*, *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *pseudomallei*, serogrupo California, *Campylobacter fetus* subsp. *Fetus*,

Campylobacter jejuni, C. coli, C. fetus subsp. Jejuni, Candida albicans, Capnocytophaga spp., virus Chikungunya, Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis, Citrobacter spp., Clonorchis sinensis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Clostridium spp. (con la excepción de las especies detalladas anteriormente), Coccidioides immitis, virus de la fiebre por garrapatas del Colorado, Corynebacterium diphtheriae, 5 Coxiella burnetii, Coxsackievirus, agente de Creutzfeldt-Jakob, agente del Kuru, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Cryptococcus neoformans, Cryptosporidium parvum, Citomegalovirus, Cyclospora cayatanensis, virus del Dengue (1, 2, 3, 4), Diphtheroids, virus de la encefalitis equina oriental (occidental), virus del Ébola, Echinococcus granulosus, Echinococcus multilocularis, Echovirus, Edwardsiella tarda, Entamoeba histolytica, Enterobacter spp., Enterovirus 70, Epidermophyton floccosum, Ehrlichia spp, Ehrlichia sennetsu, Microsporium spp. 10 Trichophyton spp., virus de Epstein-Barr, Escherichia coli, enterohemorrágica, Escherichia coli, enteroinvasiva, Escherichia coli, enteropatogénica, Escherichia coli, enterotoxigénica, Fasciola hepatica, Francisella tularensis, Fusobacterium spp., Gemella haemolysans, Giardia lamblia, virus Guanarito, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae (grupo b), Hantavirus, 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, virus del Herpes simple, Herpesvirus simiae, Histoplasma capsulatum, coronavirus humano, virus de la inmunodeficiencia Humana, papilomavirus humano, rotavirus humano, Virus linfotrópico de linfocitos T humano, virus de la gripe incluyendo H5N1, virus Junin / virus Machupo, Klebsiella spp., virus de la Enfermedad de la selva de Kyasanur, Lactobacillus spp., virus de Lassa, Legionella pneumophila, Leishmania major, Leishmania infantum, Leishmania spp., Leptospira interrogans, Listeria monocytogenes, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de Machupo, virus de Marburg, virus del sarampión, Micrococcus spp., Moraxella 20 spp., Mycobacterium spp. (distintas del M. bovis, M. tuberculosis, M. avium,, M. leprae), Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, Mycoplasma hominis, M. orale, M. salivarium, M. fermentans, Mycoplasma pneumoniae, Naegleria fowleri, Necator americanus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitides, Neisseria spp. (distintos del N. gonorrhoeae y N. meningitidis), Nocardia spp., Norwalk virus, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, Onchocerca volvulus, Opisthorchis spp., Parvovirus B19, Pasteurella spp., Peptococcus spp., Peptostreptococcus spp., Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium spp., Plesiomonas shigelloides, Powassan encefalitis virus, Proteus 25 spp., Pseudomonas spp. (distintas de P. mallei, P. pseudomallei), virus de la Rabia, virus sinticial respiratorio, Rhinovirus, Rickettsia akari, Rickettsia prowazekii, R. Canada, Rickettsia rickettsii, virus del valle del Rift, virus del río Ross / virus O'Nyong-Nyong, virus de la rubeola, Salmonella choleraesuis, Salmonella paratyphi, Salmonella typhi, Salmonella spp. (con la excepción de las especies detalladas anteriormente), Schistosoma spp., agente del prurito lumbar, Serratia spp., Shigella spp., virus Sindbis, Sporothrix schenckii, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis del valle de Murray, Staphylococcus aureus, Streptobacillus moniliformis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus faecalis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius, Taenia saginata, Taenia solium, Toxocara canis, T. cati, T. cruzi, Toxoplasma gondii, Treponema pallidum, Trichinella spp., Trichomonas vaginalis, Trichuris trichiura, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Ureaplasma urealyticum, virus 35 Vaccinia, virus Varicella-zóster, virus de la encefalitis equina oriental (EEEV), virus del síndrome respiratorio agudo grave (SRAG), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), virus de la estomatitis vesicular, Vibrio cholerae, serovar 01, Vibrio parahaemolyticus, virus del Nilo occidental, Wuchereria bancrofti, virus de la fiebre amarilla, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis, y Yersinia pestis.

Ejemplos de agentes infecciosos asociados con malignidades humanas incluyen el virus de Epstein-Barr, 40 Helicobacter pylori, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, herpesvirus-8 humano, virus de la inmunodeficiencia Humana, papilomavirus humano, virus de la leucemia de linfocitos T humano, dístoma hepático, y Schistosoma haematobium.

Una cantidad de virus están asociados con la fiebre hemorrágica viral, incluyendo los filovirus (por ejemplo, Ébola, 45 Marburg, y Reston), arenavirus (por ejemplo, Lassa, Junin, y Machupo), y bunyavirus. Además, los flebovirus, por ejemplo, el virus de la fiebre del valle del Rift, se han identificado como agentes etiológicos de la fiebre hemorrágica viral. Los agentes etiológicos de la fiebre hemorrágica y la inflamación asociada pueden además incluir paramixovirus, en particular el virus sinticial respiratorio (Feldmann, H. et al. (1993) Arch Virol Suppl. 7:81-100). Además, otros virus que causan fiebres hemorrágicas en el hombre se han identificado como pertenecientes a los siguientes grupos de virus: togavirus (Chikungunya), flavivirus (dengue, fiebre amarilla, enfermedad de la selva de 50 Kyasanur, fiebre hemorrágica de Omsk), nairovirus (fiebre hemorrágica de Crimea-Congo) y hantavirus (fiebre hemorrágica con síndrome renal, epidemia nefropática). Además, se identificó el virus Sin Nombre como el agente etiológico del brote de 1993 del síndrome pulmonar por hantavirus en el Suroeste Americano.

Los antígenos diana pueden incluir proteínas producidas por cualquiera de los organismos infecciosos descritos en 55 la presente patente, tales como, pero sin limitarse a, proteínas virales de envoltura, es decir, neuraminidasa y hemaglutinina del virus de la gripe, gp160 del VIH o derivados de la misma, Gag del VIH, Nef del VIH, Pol del VIH, proteínas de envoltura del SRAG, proteínas del virión del herpes, proteínas del VNO, etc. Los antígenos diana pueden también incluir proteínas de la superficie bacteriana que incluyen las proteínas neumocócicas PsaA, PspA, LytA, de superficie o asociadas a virulencia de patógenos bacterianos tales como *Neisseria gonorrhoea*, proteínas de la membrana exterior o proteasas de superficie.

Los antígenos diana incluyen, pero no se limitan a, antígenos obtenidos a partir de una variedad de proteínas 60 tumorales. Entre las proteínas tumorales a modo ilustrativo en la presente invención se incluyen, pero sin limitarse a

las mismas, una cualquiera o más de, WT1, p53, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, NYESO-1, MART-1, MC1 R, Gp100, PSA, PSM, Tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, Her2/neu, BRCA1, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, WT1, AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR α , y TEL/AML1. Estas y otras proteínas tumorales son conocidas para los expertos en el arte.

En determinadas realizaciones, los antígenos tumorales pueden identificarse directamente a partir de un individuo con cáncer. A este respecto, pueden realizarse cribados utilizando una variedad de tecnologías conocidas. Por ejemplo, en una realización, se toma una biopsia del tumor de un paciente, se aísla el ARN de las células tumorales y se realiza un cribado utilizando una matriz génica (por ejemplo, de Affymetrix, Santa Clara, CA) y se identifica un antígeno tumoral. Una vez que el antígeno tumoral diana es identificado, a continuación puede ser clonado, expresado y purificado utilizando técnicas conocidas en el arte. La molécula diana se liga entonces a uno o más epítomos/casetes de la presente invención según se describen en la misma, y se administra al paciente con cáncer para modificar la respuesta inmune a la molécula diana aislada del tumor. De esta manera, se contemplan "vacunas personalizadas" dentro del contexto de la invención. En determinadas realizaciones, entre los tipos de cáncer se pueden incluir carcinomas o sarcomas.

El vector adenoviral para su uso en la presente invención puede además incluir secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que aumentan la inmunogenicidad del antígeno diana. A este respecto, la proteína producida a continuación de la inmunización con el vector adenoviral que contiene una proteína de este tipo, puede ser una proteína de fusión que comprenda el antígeno diana de interés fusionado a una proteína que aumenta la inmunogenicidad del antígeno diana de interés.

En una realización, un "compañero de fusión inmunológico" de este tipo se obtiene a partir de una *Mycobacterium sp.*, tal como un fragmento Ra12 obtenido de *Mycobacterium tuberculosis*. Las composiciones de Ra12 y los métodos para su uso a la hora de aumentar la expresión y/o la inmunogenicidad de las secuencias de polipéptidos/polinucleótidos heterólogos, se describen en la solicitud de Patente estadounidense 60/158,585. Brevemente, la Ra12 hace referencia a una región de polinucleótidos que es una sub-secuencia del ácido nucleico MTB32A de la *Mycobacterium tuberculosis*. MTB32A es una serina proteasa con un peso molecular de 32 KD codificada por un gen en cepas virulentas y no virulentas de la *M. tuberculosis*. Se ha descrito la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de MTB32A (por ejemplo, en la Solicitud de Patente estadounidense 60/158,585; ver también, Skeiky et al., *Infection and Immun.* 67:3998-4007 (1999), incorporada en la presente patente a modo de referencia). Los fragmentos C-terminales de la secuencia de codificación de MTB32A expresan a niveles elevados y permanecen como polipéptidos solubles a lo largo de todo el proceso de purificación. Más aún, la Ra12 puede aumentar la inmunogenicidad de los polipéptidos inmunogénicos con los que se fusiona. Un polipéptido de fusión Ra12 comprende un fragmento C-terminal de 14 KD que corresponde a los residuos de aminoácidos 192 a 323 de MTB32A. Otros polinucleótidos de la Ra12 comprenden al menos aproximadamente 15 nucleótidos consecutivos, al menos aproximadamente 30 nucleótidos, al menos aproximadamente 60 nucleótidos, 100 nucleótidos, al menos aproximadamente 200 nucleótidos, o al menos aproximadamente 300 nucleótidos que codifican una parte de un polipéptido de la Ra12. Los polinucleótidos de la Ra12 pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido de Ra12 o una parte del mismo) o puede comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos de Ra12 pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de tal manera que la actividad biológica del polipéptido de fusión codificado no se vea sustancialmente reducida, en relación a un polipéptido de fusión que comprenda un polipéptido de Ra12 nativo. Las variantes preferiblemente muestran al menos aproximadamente un 70% de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente un 80% de identidad y de mayor preferencia al menos aproximadamente un 90% de identidad con una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de Ra12 nativo o una parte del mismo.

Dentro de otra realización, un compañero de fusión inmunológico se obtiene de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa *Haemophilus influenza B* (WO 91/18926). Preferiblemente, un derivado de la proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales), y un derivado de la proteína D puede mostrar lipídación. Dentro de determinadas realizaciones, los primeros 109 residuos de un compañero de fusión de la lipoproteína D se incluye en el extremo N-terminal para proporcionar al polipéptido epítomos de linfocitos T adicionales y para incrementar el nivel de expresión en *E. coli* (funcionando de ese modo como un potenciador de la expresión). La cola lipídica asegura una presentación óptima al antígeno para las células presentadoras del antígeno. Otros compañeros de fusión incluyen la proteína no estructural del virus de la familia *influenzae*, NS1 (hemaglutinina). Habitualmente, se utilizan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque pueden utilizarse diferentes fragmentos que incluyen epítomos T auxiliares.

En otra realización, el compañero de fusión inmunológico es la proteína conocida como LYTA, o una parte de la misma (preferiblemente, una parte C-terminal). LYTA se obtiene del *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; Gene 43:265-292, 1986). LYTA es una autolisina que degrada específicamente determinados enlaces en la cadena principal del peptidoglicano. El

dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad con la colina o con algunos análogos de la colina tales como el DEAE. Esta propiedad ha sido explotada para el desarrollo de la E. coli C-LYTA que expresa plásmidos útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el terminal amino (ver *Biotechnology* 10:795-798, 1992). Dentro de otra realización, puede incorporarse una parte de repetición de LYTA en un polipéptido de fusión. Una parte de repetición se encuentra en la región C-terminal que comienza en el residuo 178. Una parte de repetición en particular incorpora los residuos 188-305.

Métodos de uso

Los vectores adenovirales para su uso en la presente invención pueden utilizarse en varios escenarios de vacunas para generar una respuesta inmune contra uno o más antígenos diana tal como se descubre en la presente patente. Los vectores adenovirales son de particular importancia debido al resultado inesperado de que pueden utilizarse para generar respuestas inmunes en sujetos que presentan inmunidad preexistente al Ad, y pueden utilizarse en regímenes de vacunación que incluyen múltiples sesiones de inmunización utilizando los vectores adenovirales, regímenes que no son posible utilizando los vectores adenovirales de la generación previa.

Generalmente, la generación de una respuesta inmune comprende la inducción de una respuesta humoral y/o una respuesta mediada por células. En determinadas realizaciones, es deseable para aumentar una respuesta inmune contra un antígeno diana de interés. En determinadas circunstancias, generar una respuesta inmune puede implicar una disminución de la actividad y/o cantidad de ciertas células del sistema inmune o una disminución del nivel y/o actividad de ciertas citocinas u otras moléculas efectoras. Como tal, "generar una respuesta inmune" o "inducir una respuesta inmune" comprende cualquier cambio estadísticamente significativo, por ejemplo un aumento o disminución en el número de una o más células inmunes (linfocitos T, linfocitos B, células presentadoras de antígeno, células dendríticas, neutrófilos, y similares) o en la actividad de una o más de estas células inmunes (actividad de CTL, actividad de HTL, secreción de citocina, cambio en el perfil de la secreción de citocina, etc.).

El experto en el arte apreciaría fácilmente que se encuentran disponibles varios métodos para establecer si ha tenido lugar una alteración en la respuesta inmune. Una variedad de métodos para detectar alteraciones en una respuesta inmune (por ejemplo, número de células, expresión de citocinas, actividad celular), se conocen en el arte y son de utilidad en el contexto de la presente invención. Se describen métodos ilustrativos en *Current Protocols in Immunology*, Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001 John Wiley & Sons, NY, NY) Ausubel et al. (2001 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Sambrook et al. (1989 *Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY) además de en otros. Entre los métodos ilustrativos de utilidad en este contexto se incluyen la tinción intracelular de citocinas (ICS), ELISpot, ensayos de proliferación, ensayos de linfocitos T citotóxicos que incluyen liberación de cromo o ensayos equivalentes, y análisis de la expresión de genes utilizando cualquier número de ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en RT-PCR.

En determinadas realizaciones, generar una respuesta inmune comprende un aumento de la actividad de CTL específica del antígeno diana de entre 1,5 y 5 veces en un sujeto al que se administran los vectores adenovirales de la invención, en comparación con un control. En otra realización, generar una respuesta inmune comprende un incremento en la actividad de CTL específica de la diana de aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más veces en un sujeto al que se administra los vectores adenovirales en comparación con un control.

En una realización adicional, generar una respuesta inmune comprende un incremento de la actividad de HTL específica del antígeno, tal como la proliferación de linfocitos T auxiliares, de entre 1,5 y 5 veces en un sujeto al que se administra los vectores adenovirales de la invención que comprenden ácidos nucleicos que codifican el antígeno diana en comparación con un control apropiado. En otra realización, generar una respuesta inmune comprende un aumento de la actividad de HTL específica de la diana de aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más veces en comparación con un control. En este contexto, actividad de HTL comprende un aumento según se describe anteriormente, o una disminución, en la producción de una citocina en particular, tal como el interferón-gamma (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), u otras citocinas. A este respecto, generar una respuesta inmune puede comprender un cambio de una respuesta de tipo Th2 a una respuesta de tipo Th1 o en determinadas realizaciones un cambio de una respuesta de tipo Th1 a una respuesta de tipo Th2. En otras realizaciones, generar una respuesta inmune puede comprender la estimulación de una respuesta predominantemente de tipo Th1 o Th2.

En una realización adicional, generar una respuesta inmune comprende un aumento en la producción de anticuerpos específicos de la diana de entre 1,5 y 5 veces en un sujeto al que se administra los vectores adenovirales de la presente invención en comparación con un control apropiado. En otra realización, generar una respuesta inmune

comprende un aumento de la producción de anticuerpos específicos de la diana de aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más veces en un sujeto al que se administra el vector adenoviral en comparación con un control.

5 Por tanto la presente revelación proporciona métodos para generar una respuesta inmune contra un antígeno diana de interés que comprende administrar al individuo un vector adenoviral que comprende: a) un adenovirus defectuoso para la replicación, en donde el vector adenoviral presenta una delección en la región E2b, y b) un ácido nucleico que codifica el antígeno diana; y re-administrar el vector adenoviral al menos una vez al individuo; generando de ese modo una respuesta inmune contra el antígeno diana. El vector administrado no es un vector vacío o gutted.

10 En una realización adicional, la presente revelación proporciona métodos para generar una respuesta inmune contra un antígeno diana en un individuo, en donde el individuo tiene inmunidad preexistente al Ad, administrando al individuo un vector adenoviral que comprende: a) un vector adenoviral defectuoso para la replicación, en donde el vector adenoviral presenta una delección en la región E2b, y b) un ácido nucleico que codifica el antígeno diana; y re-administrar el vector adenoviral al menos una vez al individuo; generando de ese modo una respuesta inmune contra el antígeno diana.

15 Con respecto a la inmunidad preexistente al Ad, este puede determinarse utilizando métodos conocidos en el arte, tal como ensayos basados en anticuerpos para realizar pruebas para determinar la presencia de anticuerpos del Ad. Además, en determinadas realizaciones, los métodos de la presente revelación incluyen en primer lugar determinar que un individuo tiene inmunidad preexistente al Ad, y después administrar los vectores adenovirales con delección de E2b de la invención tal como se describen en la presente patente.

20 La presente revelación contempla múltiples inmunizaciones con el mismo vector adenoviral con delección de E2b o múltiples inmunizaciones con diferentes vectores adenovirales con delección de E2b. En cada caso, los vectores adenovirales pueden comprender secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos diana tal como se describe en otras partes en la presente invención. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden múltiples inmunizaciones con un adenovirus con delección de E2b que codifica un antígeno diana, y la re-administración del mismo vector adenoviral múltiples veces, induciendo de ese modo una respuesta inmune contra el antígeno diana.

También revelamos métodos que comprenden una inmunización con un primer vector adenoviral que codifica uno o más antígenos diana, y a continuación la administración con un segundo vector adenoviral que codifica uno o más antígenos diana que pueden ser el mismo o diferentes de los antígenos codificados por el primer vector adenoviral.

30 A este respecto, uno de los antígenos diana codificados puede ser diferente o todos los antígenos codificados pueden ser diferentes, o bien algunos pueden ser el mismo y algunos pueden ser diferentes. Además, en determinadas realizaciones, los métodos incluyen administrar el primer vector adenoviral múltiples veces y administrar el segundo adenovirus múltiples veces. A este respecto, los métodos comprenden administrar el primer vector adenoviral 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más veces y administrar el segundo vector

35 adenoviral 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más veces. El orden de administración puede comprender administrar el primer adenovirus una o múltiples veces consecutivas, seguido de la administración del segundo vector adenoviral una o múltiples veces consecutivas. En determinadas realizaciones, los métodos incluyen alternar la administración del primer y segundo vector adenoviral en forma de una administración de cada uno, dos administraciones de cada uno, tres administraciones de cada uno, y así sucesivamente. En determinadas

40 realizaciones, el primer y el segundo vector se administran simultáneamente. En otras realizaciones, el primer y el segundo vector adenoviral se administran secuencialmente.

Tal como entendería fácilmente un experto en el arte, pueden utilizarse más de dos vectores adenovirales en los métodos de la presente revelación. Pueden utilizarse tres, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más vectores adenovirales diferentes en los métodos de la revelación. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden administrar más de un

45 vector adenoviral con delección de E2b de una vez. A este respecto, pueden generarse respuestas inmunes contra múltiples antígenos diana de interés administrando múltiples vectores adenovirales diferentes simultáneamente, donde cada uno comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos.

La presente revelación proporciona métodos para generar una respuesta inmune contra cualquier antígeno diana, tal como los descritos en otras partes de la presente invención.

50 La presente revelación proporciona métodos para generar una respuesta inmune contra cualquier agente infeccioso, tal como los descritos en otras partes de la presente patente.

Tal como se señala en la presente patente, los vectores adenovirales de la invención comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos diana de interés de uno cualquiera o más de los agentes infecciosos contra los que se va a generar una respuesta inmune. Por ejemplo, los antígenos diana pueden incluir, pero sin limitarse a, proteínas de envoltura virales, es decir, neuraminidasa y hemaglutinina del virus de la gripe,

55

proteínas gp160, p24, gp120, gp41 del VIH, proteína de envoltura, proteasa, o transcriptasa inversa, o derivados de cualquiera de estas proteínas; proteínas de envoltura del SRAG, proteínas del virión del herpes, proteínas del VNO, etc. Los antígenos diana pueden también incluir proteínas de la superficie bacteriana que incluyen las proteínas neumocócicas PsaA, PspA, LytA, de superficie o asociadas a virulencia de patógenos bacterianos tales como *Nisseria gonorrhoea*, proteínas de la membrana exterior o proteasas de superficie.

En determinadas realizaciones, los vectores adenovirales se utilizan para generar una respuesta inmune contra un cáncer. A este respecto, los métodos incluyen generar una respuesta inmune contra carcinomas o sarcomas tales como tumores sólidos, linfomas o leucemias. Por tanto, los vectores adenovirales descritos en la presente patente se utilizan para generar una respuesta inmune contra un cáncer incluyendo, pero sin limitarse a, carcinomas o sarcomas tales como cáncer neurológico, melanoma, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemias, plasmocitomas, adenomas, gliomas, timomas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer uterino, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer cervical, cáncer testicular, cáncer gástrico, mieloma múltiple, hepatoma, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), y leucemia linfocítica crónica (LLC), u otros tipos de cáncer.

Además, a este respecto, los antígenos diana del cáncer pueden incluir pero no están limitados a antígenos obtenidos a partir de una variedad de proteínas tumorales. Las proteínas tumorales ilustrativas de utilidad en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, una cualquiera o más de p53, MAGE-A1, MAGEA2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, NY-ESO-1, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, Tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, Her2/neu, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, WT1, AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/ m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR α , y TEL/AML1. Estas y otras proteínas tumorales son conocidas para los expertos en el arte.

Se proporcionan métodos para tratar o mejorar los síntomas de cualquiera de las enfermedades infecciosas o tipos de cáncer según se describe en la presente patente. Los métodos de tratamiento comprenden administrar los vectores adenovirales una o más veces a individuos que sufren de, o se encuentran en riesgo de sufrir, una enfermedad infecciosa o cáncer, según se describe en la presente patente. Como tal, la presente revelación proporciona métodos para la vacunación contra enfermedades infecciosas o tipos de cáncer en individuos que se encuentran en riesgo de desarrollar tal enfermedad. Los individuos en riesgo pueden ser individuos que pueden estar expuestos a un agente infeccioso en algún momento o que han sido previamente expuestos pero no tienen aún síntomas, o individuos que tienen una predisposición genética para desarrollar un cáncer o que son particularmente susceptibles a un agente infeccioso.

La presente revelación contempla el uso de vectores adenovirales para la administración in vivo de ácidos nucleicos que codifican un antígeno diana. Una vez inyectado en un sujeto, la secuencia de ácido nucleico se expresa dando como resultado una respuesta inmune contra el antígeno codificado por la secuencia. La vacuna del vector adenoviral se administra en una "cantidad efectiva", es decir, una cantidad del vector adenoviral que sea efectiva en una vía o vías seleccionadas de administración para provocar una respuesta inmune según se describe en otras partes de la presente patente. En determinadas realizaciones, una cantidad efectiva es una que induce una respuesta inmune efectiva para facilitar la protección o el tratamiento del huésped contra el agente infeccioso o cáncer diana. La cantidad de vector en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmune, inmunoprotectora u otra respuesta inmunoterapéutica sin efectos adversos significativos generalmente asociados con vacunas habituales. Una vez vacunados, los sujetos pueden ser monitorizados para determinar la eficacia del tratamiento con la vacuna. La monitorización de la vacunación puede ser realizada mediante cualquier método conocido por una persona de práctica habitual en el arte. En algunas realizaciones, pueden someterse a ensayo muestras de sangre y fluidos para detectar niveles de anticuerpos. En otras realizaciones, pueden realizarse ensayos ELISpot para detectar una respuesta inmune mediada por células de las células de sangre en circulación o de células de tejido linfoide.

Los vectores adenovirales para su uso en la invención se preparan generalmente según se conoce en el arte (ver por ejemplo, Hodges et al., 2000 supra; o Amalfitano et al., 1998 supra). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, placas de cultivos celulares que contienen células E.C7 o C-7 se infectan con soluciones madre del virus del vector adenoviral en un MOI apropiado (por ejemplo, 5) y se incuban a 37,0°C durante 40 h. Las células infectadas son cosechadas, resuspendidas en un tampón adecuado tal como 10 mM de Tris-Cl (pH 8.0), y sometidas a sonicación, y el virus se purifica mediante dos sesiones de centrifugación por densidad con cloruro de cesio. En determinadas técnicas, la banda que contiene el virus es desalada sobre una columna Sephadex CL-6B (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), se añade glicerol a una concentración al 12%, y se almacenan los alícuotas a -80°C. Se mide el título de la solución madre (por ejemplo, mediante medición de la densidad óptica a 260 nm de un alícuota del virus después de la lisis con SDS). Se utilizan procedimientos de GMP (del inglés "good manufacturing practice", normas de correcta fabricación) para producir soluciones madre de Ad adecuadas para su administración en humanos cuando resulte apropiado.

Para su administración, la solución madre con el vector adenoviral se combina con un tampón apropiado, un soporte fisiológicamente aceptable, excipiente o similar. En determinadas realizaciones, una cantidad apropiada de partículas del vector adenoviral se administran en un tampón adecuado, tal como PBS estéril. En determinadas circunstancias resultará deseable administrar las composiciones con el vector adenoviral reveladas en la presente invención por vía parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal. En determinadas realizaciones, pueden prepararse en agua soluciones de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables, mezcladas de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En otras realizaciones, los vectores adenovirales con delección de E2b pueden administrarse en forma de píldora, administrados por deglución o mediante un supositorio.

Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para su uso en forma inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (por ejemplo, ver la Patente estadounidense 5,466,468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto que exista facilidad para su inyección con jeringuilla. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias, mohos y hongos. El soporte puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Puede mantenerse una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula adecuado en el caso de una dispersión, y/o mediante el uso de tensioactivos. Puede facilitarse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización, para la administración por vía parenteral en una solución acuosa, la solución debe estar tamponada de forma adecuada, si fuera necesario y el diluyente líquido debe volverse isotónico en primer lugar con suficiente suero fisiológico o glucosa. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para su administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. En conexión con ello, un medio acuoso estéril que pueda ser empleado resultará conocido para los expertos en el arte, a la luz de la presente revelación. Por ejemplo, una dosificación podría ser disuelta en 1 ml de una solución de NaCl isotónica, y o bien añadirse a 1000 ml de un fluido de hipodermoclasia o bien inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (ver por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15 edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Algunas variaciones en la dosificación serán necesarias dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individualmente. Más aún, para su administración en humanos, las preparaciones cumplirán con el estándar de esterilidad, pirogenicidad, y estándar general de seguridad y pureza, tal como requiere la oficina de la FDA de estándares biológicos.

Los soportes pueden comprender además cualquiera y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en el arte. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también ingredientes activos complementarios en las composiciones. La frase "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa alérgica o similar cuando se administra a un humano.

En determinadas realizaciones, los vectores adenovirales de la invención pueden ser administrados en conjunción con uno o más inmunostimulantes, tales como un adyuvante. Un inmunostimulante hace referencia a esencialmente cualquier sustancia que aumenta o potencia una respuesta inmune (mediada por células y/o anticuerpos) a un antígeno. Un tipo de inmunostimulante comprende un adyuvante. Muchos adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno de un catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador de las respuestas inmunes, tales como proteínas obtenidas a partir de lípido A, Bortadella pertussis o Mycobacterium tuberculosis. Determinados adyuvantes se encuentran comercialmente disponibles como, por ejemplo, adyuvante de Freund incompleto y adyuvante completo (Difco Laboratories, Detroit, MI); Adyuvante 65 de Merck (Merck y Compañía, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Filadelfia, PA); sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alum) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivados catiónicamente o iónicamente; polifosfocenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A. También pueden utilizarse como adyuvantes las citocinas, tales como GM-CSF o la interleucina-2, -7, o -12, y otros factores de crecimiento similares.

Dentro de determinadas realizaciones de la invención, la composición del adyuvante es preferiblemente una que induce una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Los niveles elevados de citocinas del tipo Th1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. En contraste, los niveles altos de las citocinas del tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10) tienden a favorecer la inducción de las respuestas humorales. A continuación de la aplicación de la vacuna según se proporciona en la presente patente, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye respuestas del tipo Th1 y Th2. Dentro de determinadas realizaciones, en las que una respuesta es predominantemente del tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará hasta un grado mayor que el nivel de citocinas del tipo Th2. Los niveles de estas citocinas pueden ser evaluadas fácilmente utilizando ensayos estándar. Para una revisión de las familias de citocinas, ver Mosmann y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989.

Determinados adyuvantes ilustrativos para provocar una respuesta predominantemente del tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferiblemente 3-de-O-acilado monofosforil lípido A, junto con una sal de aluminio. Se encuentran disponibles adyuvantes MPL $\text{\textcircled{R}}$ Glaxo-SmithKlein (Research Triangle Park, NC; ver, por ejemplo, los Nos. de patente 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG se encuentra no metilado), además inducen una respuesta predominantemente de tipo Th1. Tales oligonucleótidos se conocen bien y se describen, por ejemplo, en WO 96/02555, WO 99/33488 y las patentes estadounidenses Nos. 6,008,200 y 5,856,462. Las secuencias de ADN inmunoestimulador también se describen, por ejemplo, por Sato et al., Science 273:352, 1996. Otro adyuvante para su uso en la presente invención comprende una saponina, tal como Quil A, o derivados de la misma, incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escina; Digitonina; o saponinas *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa*. Otras formulaciones pueden incluir más de una saponina en las combinaciones adyuvantes de la presente invención, por ejemplo, combinaciones de al menos dos del siguiente grupo que comprende QS21, QS7, Quil A, β -escina, o digitonina.

En determinadas realizaciones, las composiciones pueden ser administradas mediante aerosoles intranasales, inhalación, y/u otros vehículos de administración aerosoles. La administración de fármacos utilizando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga et al., J Controlled Release 1998 Mar 2;52(1-2):81-7) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente estadounidense 5,725,871), se conocen bien en el arte farmacéutico. De igual manera, la administración de fármacos transmucosa ilustrativos en la forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente estadounidense 5,780,045.

En determinadas realizaciones, se utilizan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células/organismos adecuados. En particular, las composiciones de la presente invención pueden ser formuladas para su administración ya se encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, o en una nanopartícula o similar. De forma alternativa, las composiciones de la presente invención pueden estar enlazadas, covalente o no covalentemente, a la superficie de tales vehículos portadores.

La formación y uso de las preparaciones liposomales o de tipo liposomal como soportes potenciales de fármacos, es conocido generalmente para los expertos en el arte (ver por ejemplo, Lasic, Trends Biotechnol 1998 Jul;16(7):307-21; Takakura, Nippon Rinsho 1998 Mar;56(3):691-5; Chandran et al., Indian J Exp Biol. 1997 Aug;35(8):801-9; Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995;12(2-3):233-61; Patente estadounidense 5,567,434; Patente estadounidense 5,552,157; Patente estadounidense 5,565,213; Patente estadounidense 5,738,868 y Patente estadounidense 5,795,587, cada una incorporada específicamente en la presente patente a modo de referencia en su totalidad).

Los liposomas se han utilizado con éxito con un número de tipos de células que son normalmente difíciles de transfectar mediante otros procedimientos, incluyendo suspensiones de linfocitos T, cultivos de hepatocitos primarios y células PC 12 (Renneisen et al., J Biol Chem. 1990 Sep 25; 265(27):16337-42; Muller et al., DNA Cell Biol. 1990 Apr;9(3):221-9). Los liposomas se han utilizado de manera efectiva para introducir genes, diversos fármacos, agentes radioterapéuticos, enzimas, virus, factores de transcripción, efectores alostéricos y similares, en una variedad de líneas celulares y animales. Además, el uso de liposomas no parece estar asociado a respuestas autoinmunes o una toxicidad inaceptable después de su administración sistémica.

En determinadas realizaciones, los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman de manera espontánea vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLVs)).

De manera alternativa, en otras realizaciones, la invención proporciona formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas pueden, generalmente, atrapar los compuestos de manera estable y reproducible (ver, por ejemplo, Quintanar- Guerrero et al., Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec;24(12):1113-28). Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (con un tamaño de aproximadamente 0,1 μm) pueden ser diseñadas utilizando polímeros capaces de ser degradados in vivo. Tales partículas pueden ser realizadas tal como

se ha descrito, por ejemplo, por Couvreur et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988;5(1):1-20; zur Muhlen et al., Eur J Pharm Biopharm. 1998 Mar; 45(2):149-55; Zambaux et al. J Controlled Release. 1998 Jan 2; 50(1-3):31-40; y la patente estadounidense 5,145,684.

5 Las vías y la frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas descritas en la presente patente, además de la dosificación, variarán de un individuo a otro, y de una enfermedad a otra, y pueden ser fácilmente establecidos utilizando técnicas estándar. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden ser administradas mediante inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), por vía intranasal (por ejemplo, mediante aspiración), en forma de píldora (por ejemplo, por deglutación, o como un supositorio para la administración vaginal o rectal). En determinadas realizaciones, entre 1 y 10 dosis pueden administrarse durante un periodo de 52 semanas. En determinadas realizaciones, se administran 6 dosis, en intervalos de 1 mes, y pueden proporcionarse vacunaciones de refuerzo adicionales periódicamente después de este periodo. Protocolos alternos pueden ser apropiados para pacientes individuales. Como tales, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más dosis pueden ser administradas durante un periodo de 1 año o durante periodos más cortos o más largos, tales como durante periodos de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 semanas. Las dosis pueden administrarse en intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, o 6 semanas o intervalos de más duración.

20 Una dosis adecuada es una cantidad de un vector adenoviral que, cuando se administra tal como se ha descrito anteriormente, es capaz de promover una respuesta inmune antigénica diana, tal como se describe en otras partes de la presente patente. En determinadas realizaciones, la respuesta inmune se encuentra al menos un 10-50% por encima del nivel basal (es decir, no tratado). Una respuesta de este tipo puede ser monitorizada midiendo los anticuerpos del antígeno o antígenos diana en un paciente, o mediante la generación dependiente de la vacuna de células efectoras citotóxicas capaces de destruir las células infectadas o tumorales de un paciente in vitro, u otros métodos conocidos en el arte para monitorizar respuestas inmune. Tales vacunas deberían además ser capaz de causar una respuesta inmune que conduce a una mejora en los resultados clínicos de la enfermedad en cuestión en los pacientes vacunados, en comparación con los pacientes no vacunados.

30 En general, una dosificación y un régimen de tratamiento apropiados proporciona una cantidad suficiente de vectores adenovirales para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Una respuesta de este tipo puede ser monitorizada estableciendo una mejora en los resultados clínicos para la enfermedad en particular que esté siendo tratada, en pacientes tratados en comparación con pacientes no tratados. Tales mejoras en los resultados clínicos serían reconocidas fácilmente por el facultativo que realiza el tratamiento. Los aumentos de las respuestas inmunes preexistentes ante una proteína diana, se correlacionan generalmente con una mejora en los resultados clínicos. Tales respuestas inmunes pueden ser evaluadas, generalmente, utilizando ensayos estándar de proliferación, citotoxicidad o citocinas, que pueden realizarse utilizando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

35 Aunque una ventaja de la presente revelación es la capacidad de administrar múltiples vacunas con los mismos o diferentes vectores adenovirales, en particular en individuos con inmunidad preexistente al Ad, las vacunas adenovirales de esta revelación pueden también administrarse como parte de un régimen de inducción y refuerzo. Un esquema de inoculación de modalidad mixta de inducción y refuerzo puede dar como resultado un aumento de la respuesta inmune. Por tanto, se describe un método para la inducción en un sujeto con una vacuna plasmídica, tal como un vector plasmídico que comprende un antígeno diana de interés, administrando la vacuna plasmídica al menos una vez, permitiendo que transcurra un periodo de tiempo determinado, y a continuación aplicando un refuerzo mediante la administración de un vector adenoviral. Pueden emplearse múltiples vacunaciones, por ejemplo, 1-4, aunque pueden utilizarse más. La duración del tiempo entre la inducción y el refuerzo puede variar habitualmente de aproximadamente cuatro meses a un año, pero otros marcos de tiempo pueden ser utilizados. En determinadas realizaciones, los sujetos pueden ser vacunados cuatro veces con vacunas plasmídicas, y a continuación se les aplica un refuerzo 4 meses más tarde con el vector adenoviral.

Ejemplos

Ejemplo 1

Múltiples inyecciones del vector adenoviral AD5NULL produce anticuerpos anti-adenovirus

50 Este ejemplo muestra que múltiples inyecciones de Ad5-null dan como resultado la producción de anticuerpos anti-adenovirus en los sujetos inyectados.

Se demostró que el vector adenoviral AdNull que no contiene ninguna secuencia de ácido nucleico heterólogo, genera una respuesta inmune neutralizante en ratones. En particular, en un experimento, se inmunizaron ratones hembra Balb/c de 5-7 semanas de edad, con partículas virales de Ad5Null en intervalos de 14 días. Para determinar la presencia de anticuerpos anti-adenovirus, se utilizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Para este ELISA, se recubrieron pocillos de microtitulación con 10^9 partículas virales en 100 μ L de tampón de 0,05M carbonato/bicarbonato, pH 9,6, y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Para una curva de referencia estándar de la inmunoglobulina G (IgG), se recubrieron pocillos de microtitulación con 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, y 0 ng de IgG de ratón purificada (Sigma Chemicals), según se describe anteriormente. Tras la incubación, se lavaron todos los pocillos 3 veces con 250 μ L de albúmina de suero bovino al 1 % (BSA) en una solución tampón de fosfatos (PBS), pH 7,4. Después del lavado, se añadió a todos 250 μ L de BSA/PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear los sitios no enlazados. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a los pocillos 200 μ L de una dilución de suero en una relación 1/100 en BSA/PBS, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para un control positivo, se añadió a los pocillos 200 μ L de una dilución en una relación 1/10000 de antisuero anti-adenovirus (Biodesign International) en BSA/PBS. Los pocillos de control contenían únicamente BSA/PBS. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a cada pocillo 200 μ L de una dilución en una relación 1/10000 de IgG anti-ratón de cabra específico de la cadena gamma conjugado con peroxidasa (Sigma Chemicals) en BSA/PBS, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a cada pocillo 200 μ L de reactivo revelador (0,5 mg/mL de 1,2 fenilendiamina en tampón de 0,2M de fosfato de potasio, pH 5,0, que contiene 0,06% de peróxido de hidrógeno) y se incubaron durante 30-40 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la reacción de color se detuvo mediante adición de 50 μ L de 5N HCl a cada pocillo. Todos los pocillos se leyeron a continuación en un lector de placa de micropocillos a 492 nm. Después de que se obtuvieran las lecturas, se correlacionaron las lecturas de la densidad óptica de muestras desconocidas con la curva de IgG estándar para obtener los nanogramas de la IgG enlazada por pocillo. Esto se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico INSTAT.

Tal como se muestra en la Figura 1, se detectaron niveles significativos ($P < 0.001$) de anticuerpos IgG anti-adenovirus en ratones dos semanas después de una primera inyección con 10^{10} de Ad-5-null. Se observó un nivel significativamente más elevado ($P < 0.001$) 2 semanas después de una segunda inyección con 10^{10} de adenovirus. Continuó observándose niveles significativamente más altos ($P < 0.001$) de anticuerpos 2 semanas después de una tercera inyección con 10^{10} de Ad5-null. Cada valor representa la media de determinaciones por triplicado de pool de sueros de 5 ratones en cada grupo. Estos resultados indican que múltiples inyecciones de Ad5-null dan como resultado la producción de anticuerpos anti-adenovirus en los sujetos inyectados.

Para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes del Ad, se utilizó el siguiente ensayo. Se cultivó una línea celular HEK-293T en 200 μ L de un medio de cultivo que consiste en DMEM que contiene suero fetal bovino al 10% (DMEM/FCS) en placas de cultivo tisular en micropocillos a una concentración celular de 2×10^3 células por pocillo durante 24 horas a 37° C en CO₂ al 5%. Después de la incubación, se retiraron 100 μ L de medio de cultivo de los pocillos triplicados y se mezclaron con 20 μ L de DMEM/FCS que contenían partículas virales (VP). Después de mezclar, la mezcla de 120 μ L se volvió a añadir a los respectivos micropocillos. En otro conjunto de pocillos triplicados, se retiraron 100 μ L de medio de cultivo y se mezclaron con 20 μ L de suero de ratón inmune al Ad inactivado por calor (56° C durante 1 hora) previamente incubado con VP durante una hora a temperatura ambiente. Después de mezclar, la mezcla de 120 μ L se volvió a añadir a los respectivos pocillos. En pocillos de control celular triplicados, se añadieron 20 μ L de DMEM/FCS para controlar el volumen total del medio de cultivo. Los pocillos triplicados en medio solo de control, contenían 220 μ L de DMEM/FCS. La placa de cultivo de tejido se incubó durante un periodo adicional de 3 días a 37° C en CO₂ al 5%. Después de la incubación, se añadieron 40 μ L del reactivo de viabilidad celular PROMEGA (reactivo de Owen) y se incubaron durante 75 minutos a 37°C en CO₂ al 5%. En este ensayo, el reactivo de Owen (compuesto de tetrazolio MTS) es bioreducido por células viables a un producto de formazán coloreado que es soluble en un medio de cultivo tisular. La cantidad de producto de formazán según se mide por la absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Después de la incubación, 150 μ L fueron retirados de cada pocillo y transferidos a otra placa de micropocillos para las lecturas de la densidad óptica. Las lecturas de densidad óptica a 492 fueron obtenidas posteriormente utilizando un lector de placas de micropocillos.

En un experimento para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes para el Ad, se inyectaron grupos de 5 ratones cada uno se inyectaron una vez, dos veces, o tres veces con 10^{10} de Ad5null en intervalos de dos semanas. Dos semanas después de la inyección final del virus, los ratones se desangraron, se agruparon, y fueron evaluados para determinar los anticuerpos neutralizantes tal como se describe anteriormente, utilizando 4×10^7 VP incubadas con o sin sueros inactivados por calor. Las células cultivadas solas se utilizaron como grupo de control. Tal como se muestra en la Figura 2, los ratones normales y los ratones inyectados una vez con Ad5null no mostraron niveles significativos de anticuerpo neutralizante. Los ratones inyectados dos veces con el Ad mostraron niveles significativos ($P < 0,05$) de anticuerpo neutralizante en comparación con las células incubadas únicamente con el virus. Los ratones inyectados tres veces con Ad5-null también mostraron niveles significativos ($P < 0,01$) de anticuerpo neutralizante en comparación con las células cultivadas únicamente con el virus.

Ejemplo 2

Las inyecciones múltiples de un vector adenoviral con delección de E2b generan una respuesta inmune contra antígenos diana

Este ejemplo muestra que las inyecciones múltiples de un vector adenoviral con delección de E2b que contiene gag del VIH da como resultado la producción de inmunidad a gag del VIH.

5 Dos grupos de ratones se utilizaron para este experimento. Un grupo se utilizó como un grupo de control normal. El segundo grupo fue inyectado 3 veces con Ad con delección de E2b que contiene gag del VIH en intervalos de 2 semanas. Cuatro semanas después de la última inyección, los ratones se desangraron y se evaluaron para determinar los niveles de anticuerpos IgG utilizando un ensayo ELISA de la siguiente forma: para este ensayo, se recubrieron pocillos de microtitulación con las proteínas gag del VIH p17/p24, en 100 μ L de un tampón de 0,05M carbonato/bicarbonato, pH 9,6, y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Para una curva de referencia estándar de la IgG, se recubrieron pocillos de microtitulación con IgG de ratón purificada (SigmaChemicals) en cantidades de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, y 0 ng, tal como se describe anteriormente. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en una solución tampón de fosfatos (PBS), pH 7,4. Después del lavado, se añadió a los pocillos 200 μ L de BSA/PBS, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear cualquier sitio restante en los pocillos de microtitulación. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a los pocillos 200 μ L de una dilución a una relación de 1/100 de suero de ratón en BSA/PBS, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Para un control positivo, se añadieron a los pocillos 100 ng de un anticuerpo monoclonal IgG anti-p24 en BSA/PBS. Los pocillos de control en blanco contenían únicamente BSA/PBS. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a cada pocillo 200 μ L de una dilución en una relación 1/10000 de IgG anti-ratón de cabra específico de la cadena gamma conjugado con peroxidasa (Sigma Chemicals) en BSA/PBS, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a cada pocillo 200 μ L de reactivo revelador (0,5 mg/mL de 1,2 fenilendiamina en tampón de 0,2M de fosfato de potasio, pH 5,0, que contiene 0,06% de peróxido de hidrógeno) y se incubaron durante 30-40 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la reacción de color se detuvo mediante adición de 50 μ L de 5M HCl a cada pocillo. Todos los pocillos se leyeron a continuación en un lector de placa de micropocillos a 492 nm. Después de que se obtuvieran las lecturas, se correlacionaron las lecturas de la densidad óptica de muestras desconocidas con la curva de IgG estándar para obtener los nanogramas de la IgG enlazada por pocillo. Esto se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico INSTAT.

Tal como se muestra en la Figura 3, se detectaron niveles bajos pero significativos de Gag IgG en los ratones 2 semanas después de una segunda inyección y 4 semanas después de una tercera inyección con 10^{10} de Ad con delección de E2b que contenía el gen gag del VIH. Más aún, cuando se comparó con las respectivas extracciones de sangre previas a las inyecciones, se observaron niveles bajos pero significativos ($P < 0,01$) de anticuerpos detectables hasta 8 semanas (Día 84), además de 13 semanas (Día 119), posteriores a la 3ª inyección con la vacuna con el vector Adgag con delección de E2b.

Ejemplo 3

Las múltiples inyecciones de un vector adenoviral con delección de E2b generan una respuesta inmune contra múltiples antígenos diana.

40 Este ejemplo demuestra que los ratones inyectados en múltiples ocasiones con vacunas de vectores adenovirales con delección de E2b, que expresan un primer antígeno diana (gag del VIH), y posteriormente inyectados en múltiples ocasiones con un vector adenoviral con delección de E2b que expresa un segundo antígeno diana (β -galactosidasa), producen una respuesta inmune contra el primer y el segundo antígeno.

45 A un grupo de cinco ratones se inyectó en 3 ocasiones, en intervalos de 2 semanas, 10^{10} de una vacuna de vector adenoviral con delección de E2b que contenía el gen gag del VIH. Cuatro semanas más tarde, se inyectó a los ratones en dos ocasiones en un intervalo semanal, 10^{10} de una vacuna de vector adenoviral con delección de E2b que contenía β -galactosidasa. Un grupo de 5 ratones se utilizó como grupo de control normal. Los sueros de ratones a los que se inyectó únicamente el Ad- β gal con delección de E2b, que mostraron niveles elevados de anticuerpos IgG de β -galactosidasa, se utilizaron como control positivo.

50 Para determinar la presencia de β -galactosidasa, se utilizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para este ELISA, se recubrieron pocillos de microtitulación con 100ng de β -galactosidasa purificada en 100 μ L de tampón de 0,05M carbonato/bicarbonato, pH 9,6, y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Para una curva de referencia estándar de la IgG, se recubrieron pocillos de microtitulación con IgG de ratón purificada (SigmaChemicals) en cantidades de 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, y 0 ng, tal como se describe anteriormente. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en una solución tampón de fosfatos (PBS), pH 7,4. Después del lavado, se añadió a todos los pocillos 200 μ L de BSA/PBS, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación,

5 todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a los pocillos 200 μ L de una dilución a una relación de 1/100 de suero en BSA/PBS, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos de control en blanco contenían únicamente BSA/PBS. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a cada pocillo 200 μ L de una dilución en una relación 1/10000 de IgG anti-ratón de cabra específico de la cadena gamma conjugado con peroxidasa (Sigma Chemicals) en BSA/PBS, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, todos los pocillos se lavaron 3 veces con 250 μ L de BSA/PBS. Después del lavado, se añadió a cada pocillo 200 μ L de reactivo revelador (0,5 mg/mL de 1,2 fenilendiamina en tampón de 0,2M de fosfato de potasio, pH 5,0, que contiene 0,06% de peróxido de hidrógeno) y se incubaron durante 30-40 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la reacción de color se detuvo mediante adición de 50 μ L de 5N HCl a cada pocillo. Todos los pocillos se leyeron a continuación en un lector de placa de micropocillos a 492 nm. Después de que se obtuvieran las lecturas, se correlacionaron las lecturas de la densidad óptica de muestras desconocidas con la curva de IgG estándar para obtener los nanogramas de la IgG enlazada por pocillo. Esto se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico INSTAT.

15 Tal como se muestra en la Figura 4, los sueros evaluados 2 semanas después de la última inyección procedentes de los ratones a los que se inyectó un vector adenoviral con delección de E2b que contenía β -galactosidasa de *E. coli*, mostraron niveles significativamente más elevados ($P < 0,01$) de anticuerpos IgG anti- β -galactosidasa, en comparación con ratones de control normales. Los niveles detectados de anticuerpos anti- β -galactosidasa persistieron hasta 5 semanas después de la última inyección. Más aún, seguían siendo todavía fácilmente detectables niveles significativos de inmunidad a gag del VIH, y los niveles de estos anticuerpos incluso aumentaron.

25 En un experimento relacionado, se evaluaron las respuestas inmunes celulares en los ratones después de múltiples inmunizaciones. Los ratones fueron inmunizados con una vacuna de vector adenoviral con delección de E2b que contenía el gen gag del VIH tres veces en intervalos de 14 días. Cuatro semanas más tarde, los ratones fueron inmunizados posteriormente con una vacuna de vector adenoviral con delección de E2b que contenía el gen de la β -galactosidasa dos veces en intervalos de 14 días. Se realizaron ensayos ELISpot para determinar las respuestas inmunes mediadas por células en los sujetos vacunados. Los kit de ensayo ELISpot se obtuvieron de eBioscience y las placas de ensayo se prepararon según las especificaciones del fabricante. El ensayo fue realizado tal como se describe en las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recubrieron las placas de ensayo ELISpot con el anticuerpo de captura siguiendo las instrucciones y se dejaron recubiertas durante la noche. Después del lavado y el bloqueo de los sitios no enlazados, el antígeno específico, y los controles, se añadieron a los pocillos en medio de cultivo RPMI-1640 completo a razón de 100 μ L por pocillo. Se cosecharon células del bazo de ratones y se prepararon para un cultivo celular. Las células se añadieron a continuación a los pocillos en un volumen de 100 μ L a la densidad celular deseada. Las placas de ELISpot fueron incubadas entonces a 37° C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% durante aproximadamente 48 horas. Después de la incubación, las placas de ELISpot se revelaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los datos se expresaron como el número de células formadoras de puntos o spots (SFC, por sus siglas en inglés) por 10⁶ esplenocitos.

40 Tal como se utiliza en la Figura 5A, el análisis ELISpot demostró que los ratones mostraron producción de interferón- γ (IFN- γ) tras la re-estimulación de los viriones de gag del VIH y Ad5null. Además, tal como se muestra en la Figura 5B, el análisis por ELISpot también mostró la producción de interleucina-2 (IL-2) tras la re-estimulación con viriones de gag del VIH, β -galactosidasa, y Ad5null. Estos resultados indicaron que las respuestas inmunes mediadas por células podrían ser generadas en los mismos sujetos después de múltiples inyecciones con vacunas con vectores adenovirales con delección de E2b que codifican 2 antígenos diana diferentes. Más aún, la respuesta inmune mediada por células contra el segundo antígeno de inmunización tuvo lugar en presencia de inmunidad al Ad.

45 Por tanto, los vectores adenovirales con delección de E2b de la presente invención pueden ser utilizados para inmunizar contra múltiples antígenos utilizando regímenes de múltiples inmunizaciones.

Ejemplo 4

La inducción de la respuesta inmune mediada por células (CMI) en macacos cynomolgus inmunes al adenovirus 5.

Este ejemplo muestra que múltiples inyecciones de un vector adenoviral con delección de E2b que contiene gag del VIH, dan como resultado la producción de inmunidad a gag del VIH, incluso en presencia de inmunidad al Ad5.

50 Se inyectó a tres primates no humanos (PNH) una única dosis de 10¹⁰ VP viables de Ad5 de tipo silvestre. El anticuerpo neutralizante de Ad5 (NAb) se midió 30 días después de la administración, y los títulos de los PNH fueron $\geq 1:50$ (Figura 6). Los PNH inmunes al Ad5 fueron inmunizados a continuación tres veces; días 0, 27, y 58; con Ad5 [E1-, E2b-]-gag (10¹⁰ VP/dosis). Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los individuos PNH en los puntos de tiempo indicados. Las respuestas CMI tras la re-estimulación con la proteína gag del VIH se sometieron a ensayo 32 días después de la inmunización final con Ad5 [E1-, E2b-]-gag. El análisis ELISpot indicó que las PBMC de todos los tres PNH respondieron de forma similar a la re-estimulación con la proteína gag del VIH con una frecuencia media de 223 SFC/10⁶ PBMC que producían INF- γ y 207 SFC/10⁶ PBMC

que producían IL-2 (Figura 7A y Figura 7B, respectivamente). Estos valores fueron elevados de forma significativa ($P < 0,05$) cuando se comparan con sus valores de línea de referencia. Los títulos del NAb viral del Ad5 se encontraron en un rango de 1/1000 a 1/20,000 a la terminación de este estudio (Figura 6).

5 Tal como se ha evidenciado mediante la inducción de respuestas CMI específicas a la proteína gag del VIH, estos resultados indican que los PNH pueden ser inmunizados con éxito con una plataforma de vectores Ad5 [E1-, E2b-] en presencia de inmunidad al Adenovirus 5.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector adenoviral defectuoso para la replicación, en donde la región E1 se elimina, y el gen de la ADN polimerasa y la proteína preterminal (pTP) de la región E2b se eliminan, en donde el vector adenoviral defectuoso para la replicación no es un vector vacío, y en donde el vector adenoviral comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno diana,
- para su uso en un método para el tratamiento del cáncer o de una enfermedad infecciosa, o para la vacunación contra el cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto, generando una respuesta inmune en el sujeto contra el antígeno diana expresado en el sujeto por el vector adenoviral defectuoso para la replicación, en donde el método comprende
- 10 (i) administrar el vector adenoviral al sujeto; y
- (ii) re-administrar el vector adenoviral al sujeto,
- para generar una respuesta inmune contra el antígeno diana.
2. Vector adenoviral defectuoso para la replicación para su uso según la reivindicación 1, en donde el sujeto presenta inmunidad preexistente a adenovirus.
- 15 3. Vector adenoviral defectuoso para la replicación para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno diana del vector adenoviral defectuoso para la replicación comprende un antígeno seleccionado de una proteína cancerígena o un fragmento de la misma que induce una respuesta inmune, un antígeno bacteriano, y un antígeno viral.
- 20 4. Vector adenoviral defectuoso para la replicación para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno diana del vector adenoviral defectuoso para la replicación comprende una proteína protozoaria, una proteína fúngica, una proteína de mohos, una proteína de mamíferos, y una proteína aviar, o un fragmento de la misma que induce una respuesta inmune.
5. Vector adenoviral defectuoso para la replicación para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno diana del vector adenoviral defectuoso para la replicación comprende:
- 25 (i) una proteína del VIH, una proteína del virus herpes simple, una proteína del virus de la hepatitis C, proteína de la malaria, proteína de la peste, proteína de M. tuberculosis, una proteína de Streptococcus pneumoniae, una proteína de Leishmania, o un fragmento inmunogénico de las mismas; o
- (ii) una proteína del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), proteína del virus de la encefalitis equina occidental, o proteína del virus de la encefalitis japonesa, o un fragmento inmunogénico de
- 30 cualquiera de las mismas.
6. Vector adenoviral defectuoso para la replicación para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno diana del vector adenoviral defectuoso para la replicación comprende una proteína del virus de la gripe, de un virus de la gripe seleccionado de H5N1, H3N2, H9N1, H1N1, H2N2, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, y H10N7.
- 35 7. Vector adenoviral defectuoso para la replicación para su uso según la reivindicación 6, en donde la proteína del virus de la gripe se selecciona de hemaglutinina, neuraminidasa y proteína matricial M1.
8. Vector adenoviral defectuoso para la replicación para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el antígeno diana del vector adenoviral defectuoso para la replicación comprende una proteína del virus del VIH.
9. Vector adenoviral defectuoso para la replicación para su uso según la reivindicación 8, en donde la proteína del VIH es una proteína gag del VIH.

40

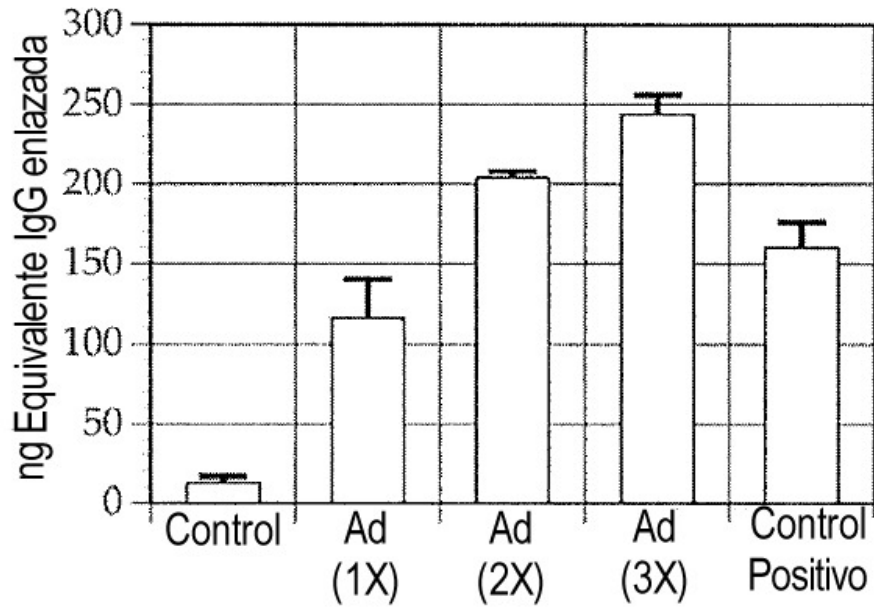


FIG. 1

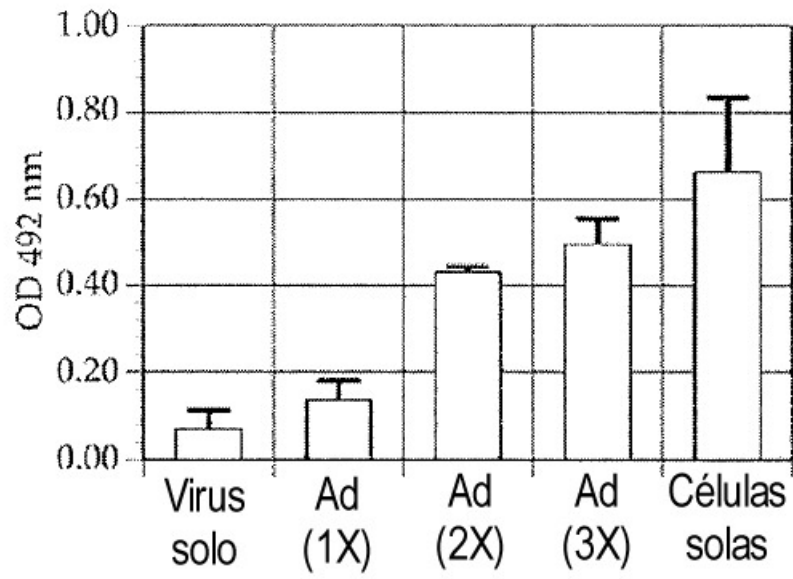


FIG. 2

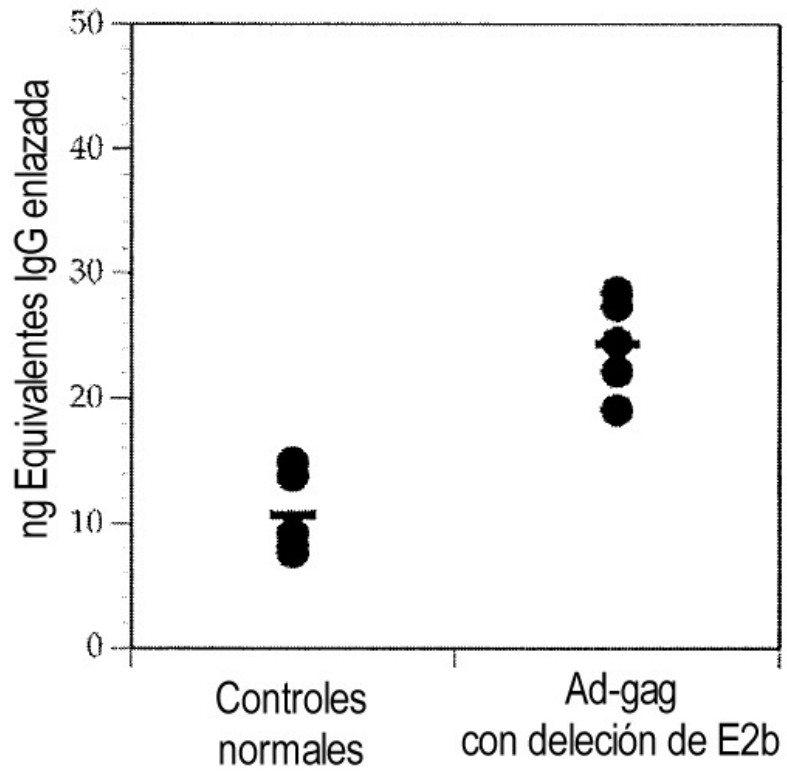


FIG. 3

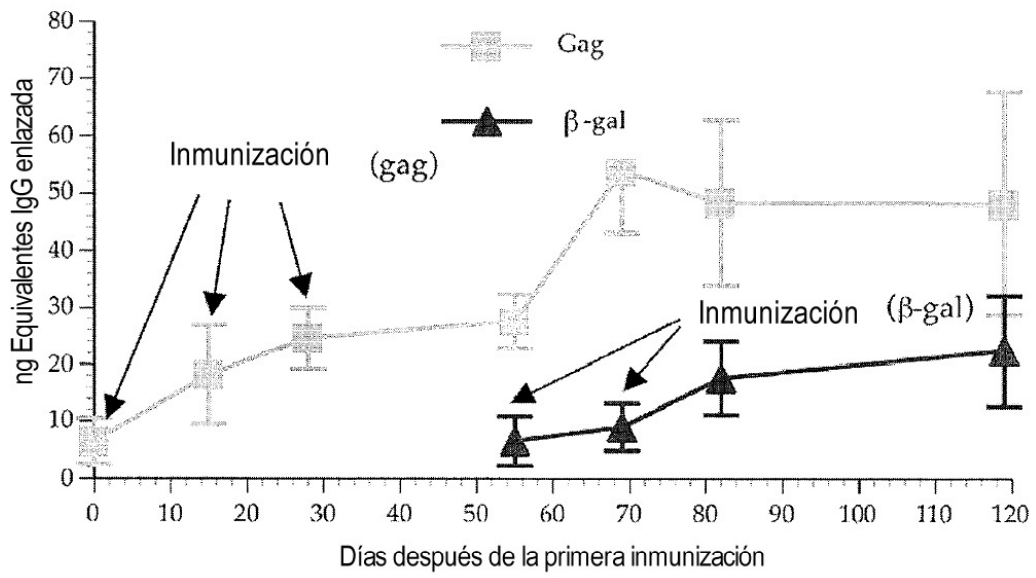


FIG. 4

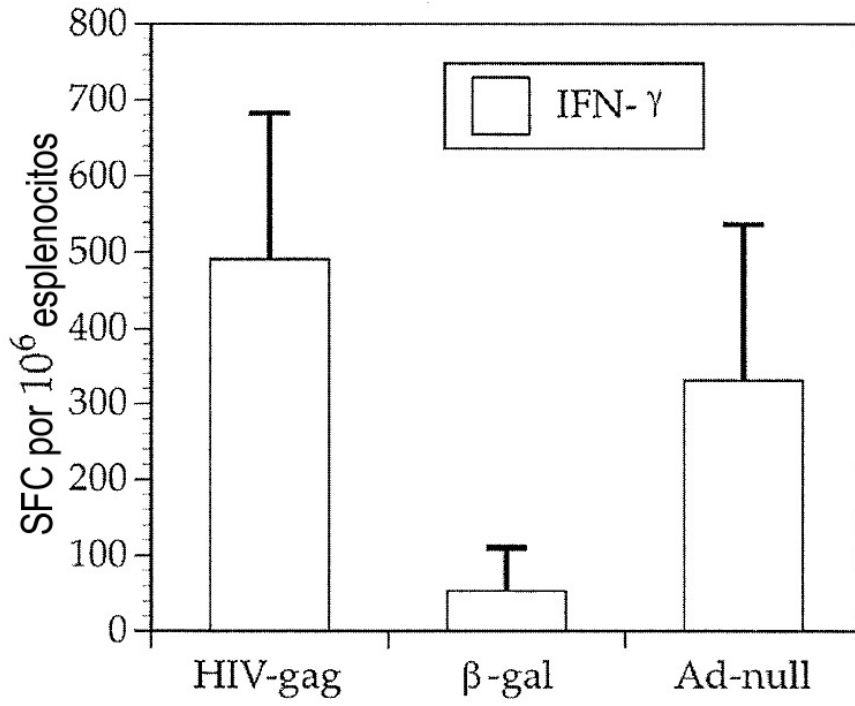


FIG. 5A

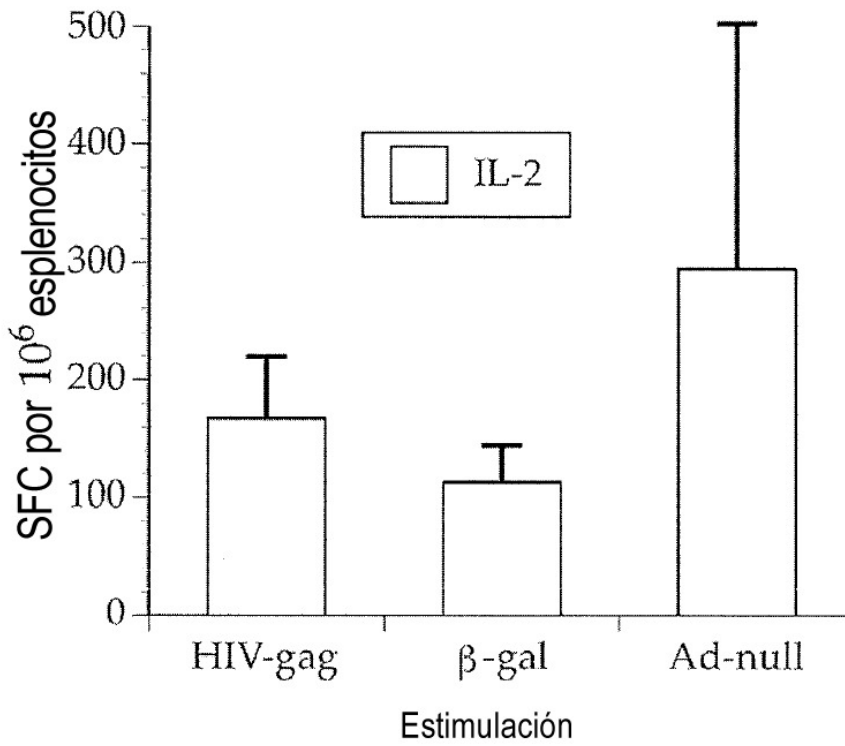


FIG. 5B

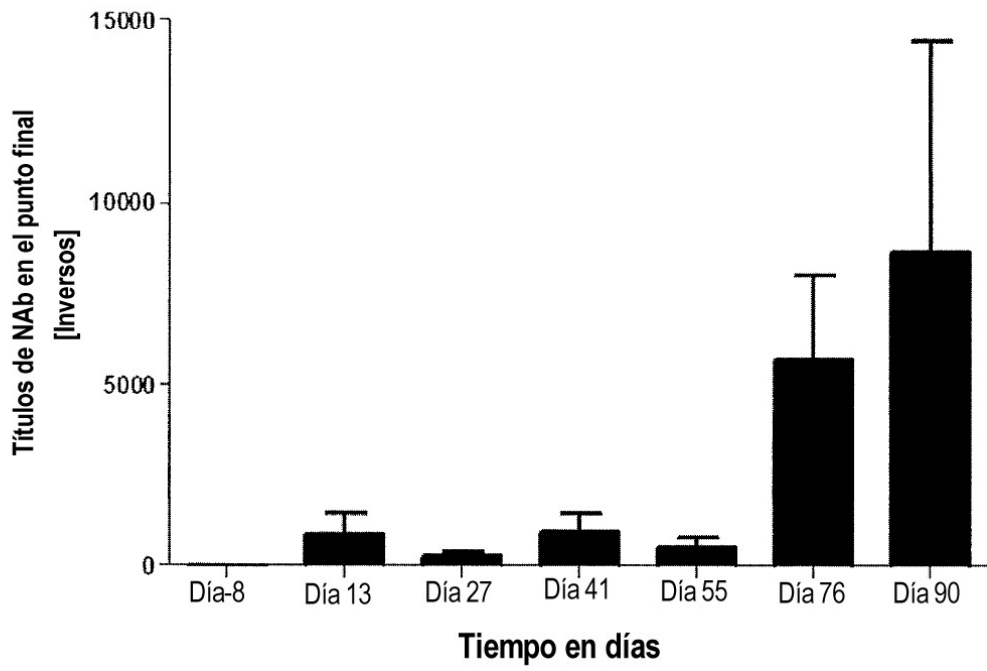


FIG. 6

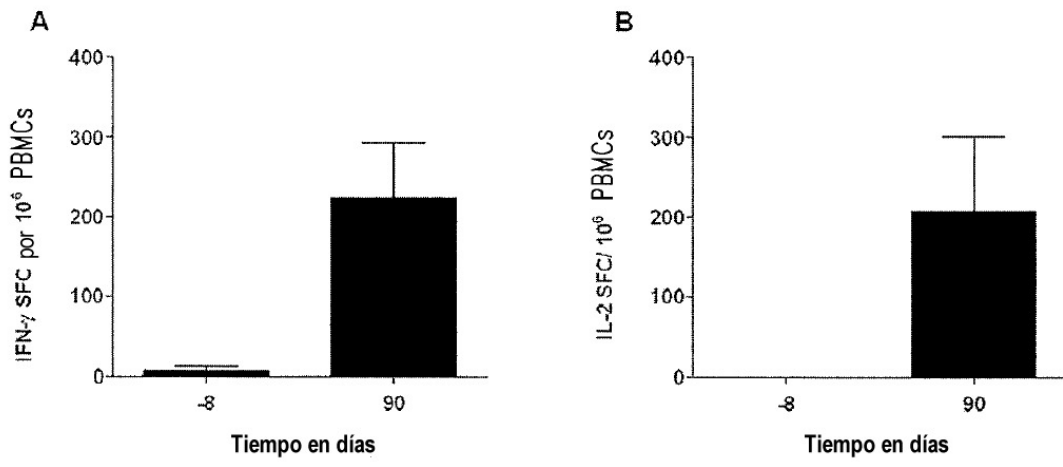


FIG. 7