

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 204**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7052 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2010** **PCT/US2010/021869**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.07.2010** **WO10085697**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2010** **E 10733940 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016** **EP 2393496**

54 Título: **Vacunas mejoradas para el virus del papiloma humano y métodos para usarlas**

30 Prioridad:

21.01.2010 US 691588

23.01.2009 US 146942 P

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

28.11.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**WEINER, DAVID, B. y
YAN, JIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 592 204 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

Vacunas mejoradas para el virus del papiloma humano y métodos para usarlas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas de papilomavirus humano (HPV) mejoradas, y a su uso en la inducción de respuestas inmunitarias, y en inmunización profiláctica y/o terapéutica de individuos contra el HPV.

10 Antecedentes de la invención

Los papilomavirus son virus de ADN pequeños que comprenden hasta siete genes tempranos y dos genes tardíos. En general, los genes tempranos del virus del papiloma se designan E1-E7, y los genes tardíos del virus del papiloma se designan L1 y L2. Pueden infectarse varias especies de animales por miembros de la familia del papilomavirus.

La infección por papilomavirus humano (HPV) es común y puede transmitirse por vía sexual. El HPV se ha diferenciado en 56 o más tipos basándose en la homología de secuencia de ADN. Los HPV tipos 16 y 18, que provocan displasia epitelial y otras lesiones, se asocian con frecuencia a un riesgo aumentado de cáncer, particularmente carcinomas *in situ* e invasivos del cuello uterino, vagina, vulva y canal anal.

Las vacunas de ADN tienen muchas ventajas conceptuales con respecto a los métodos de vacunación más tradicionales, tales como virus atenuados vivos y vacunas basadas en proteínas recombinantes. Las vacunas de ADN son seguras, estables, se producen fácilmente y se toleran bien en seres humanos con pruebas pre-clínicas que indican pocas pruebas de integración plasmídica [Martin, T., *et al.*, Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(5): p. 759-68; Nichols, W.W., *et al.*, Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 772: p. 30-9]. Además, las vacunas de ADN están bien adaptadas para administración repetida debido al hecho de que la eficacia de la vacuna no está influida por títulos de anticuerpos preexistentes para el vector [Chattergoon, M., J. Boyer, y D.B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J*, 1997. 11(10): p. 753-63]. Sin embargo, un obstáculo importante para la adopción clínica de vacunas de ADN ha sido una reducción de la inmunogenicidad de las plataformas cuando se mueven a animales mayores [Liu, M.A. y J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet*, 2005. 55: p. 25-40]. Los avances tecnológicos recientes en la ingeniería de inmunógeno de vacuna de ADN, tal como optimización de codones, optimización de ARN y la adición de secuencias líder de inmunoglobulina han mejorado la expresión e inmunogenicidad de las vacunas de ADN [Andre, S., *et al.*, Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1497-503; Deml, L., *et al.*, Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., *et al.*, Immunogenicity of novel consensus based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., *et al.*, Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33], así como tecnología desarrollada recientemente en sistemas de suministro de plásmidos tales como electroporación [Hirao, L.A., *et al.*, Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., *et al.*, Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., *et al.*, In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4741-53]. Además, algunos estudios han sugerido que el uso de inmunógenos consenso puede ser capaz de aumentar la amplitud de la respuesta inmunitaria celular en comparación con antígenos nativos solos [Yan, J., *et al.*, Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., *et al.*, Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*, 2007. 81(16): p. 8507-14]. Yan *et al.*, *Vaccine*, 2008, 26(40): 5210-5215 desvela un inmunógeno de fusión basado en E6 y E7 consenso de HPV 18.

55 Sigue existiendo la necesidad de vacunas y métodos mejorados para prevenir y tratar la infección por HPV.

Sumario de la invención

60 La materia objeto para la que se busca protección es como se define en las reivindicaciones.

Se proporcionan proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos consenso de E6 y E7 de HPV Tipo 18 (HPV 18) y moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican dichas proteínas. Estas construcciones de ácido nucleico y proteínas codificadas por las mismas proporcionan dianas inmunogénicas mejoradas contra las que puede generarse una respuesta inmunitaria anti-HPV.

También se proporcionan construcciones que codifican dichas proteínas, vacunas que comprenden dichas proteínas, vacunas que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas y métodos para inducir respuestas inmunitarias anti-HPV.

- 5 Los aspectos de la invención incluyen una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5.

10 La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico y su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo contra HPV que comprende administrar a un individuo una composición que comprende dichas moléculas de ácido nucleico.

15 La presente invención proporciona además vacuna recombinante que comprende dichas moléculas de ácido nucleico y su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo contra HPV que comprende administrar a un individuo dicha vacuna recombinante.

La presente invención proporciona además vacunas vivas atenuadas que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico para su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo contra HPV que comprende administrar a un individuo dichas vacunas vivas atenuadas.

20 La presente divulgación también se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NO: 2, secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de homología con SEQ ID NO: 2; secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos de SEQ ID NO: 2, secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de homología con fragmentos de SEQ ID NO: 2; secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NO: 6; secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos de SEQ ID NO: 6 incluyendo secuencias de HPV; secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de homología con SEQ ID NO: 6 incluyendo secuencias de HPV; y secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de homología con fragmentos de SEQ ID NO: 6 que incluyen secuencias de HPV.

30 La presente divulgación proporciona además proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, secuencias que tienen al menos 90 % de homología con SEQ ID NO: 2; fragmentos de SEQ ID NO: 2; fragmentos de secuencia que tienen al menos 90 % de homología con SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 6, secuencias que tienen al menos 90 % de homología con SEQ ID NO: 6; fragmentos de SEQ ID NO: 6; y fragmentos de secuencias que tienen al menos 90 % de homología con SEQ ID NO: 6.

35 La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas y su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo contra HPV que comprende administrar a un individuo una composición que comprende dichas proteínas.

40 La presente divulgación proporciona además vacunas recombinantes que comprenden dichas proteínas y su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo contra HPV que comprenden administrar a un individuo dicha vacuna recombinante.

45 La presente divulgación proporciona además patógenos atenuados vivos que comprenden dichas proteínas y su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo contra HPV que comprenden administrar a un individuo dichos patógenos atenuados vivos.

50 Breve descripción de la figura

La Figura 1 proporciona una descripción de la construcción plasmídica.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

55 Como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones de hibridación rigurosas” o “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones en las que una molécula de ácido nucleico hibridará con otra molécula de ácido nucleico, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. En general, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5 °C menores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (con fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias de la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Ya que las secuencias diana están generalmente presentes en exceso, a T_m, el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio. Típicamente, las condiciones rigurosas serán en las que la concentración salina es ion sódico menor de aproximadamente 1,0 M, típicamente ion sódico de aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH 7,0 hasta 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas, cebadores u oligonucleótidos (por ejemplo de 10 a 50 nucleótidos) y al menos

aproximadamente 60 °C para sondas más largas, cebadores u oligonucleótidos. Pueden conseguirse también condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

La homología de secuencia para nucleótidos y aminoácidos puede determinarse usando FASTA, BLAST y BLAST con huecos (Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389) y software PAUP* 4.0b10 (D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). El "porcentaje de similitud" se calcula usando software PAUP* 4.0b10 (D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). La similitud promedio de la secuencia consenso se calcula en comparación con todas las secuencias en el árbol filogenético.

Brevemente, el algoritmo de BLAST, que significa herramienta de búsqueda de alineamiento local básico es adecuado para determinar la similitud de secuencia (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410). Está disponible públicamente software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar un par de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden con o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra cercana (Altschul *et al.*, mencionado anteriormente). Estas aciertos de palabra cercanos iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que los contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como puede aumentarse la puntuación de alineamiento acumulativa. La extensión para los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: 1) la puntuación de alineamiento acumulada cae la cantidad X desde su valor conseguido máximo; 2) la puntuación acumulada va hasta cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o 3) se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros de algoritmo Blast W, T y X determina la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa Blast usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST (Karlin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5877) y BLAST con huecos realizan un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de menor suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a otros si la probabilidad de menor suma en comparación del ácido nucleico de ensayo con el otro ácido nucleico es menor de aproximadamente 1, preferentemente menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01 y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción genética" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica proteína. La secuencia codificante incluye señales de inicio y terminación unidas operativamente con elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células del individuo al que se administra la molécula de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "forma expresable" se refiere a construcciones génicas que contienen los elementos reguladores necesarios unidos operativamente a una secuencia codificante que codifica una proteína de modo que cuando está presente en la célula del individuo, se expresará la secuencia codificante.

Se desvelan vacunas mejoradas que surgen de una estrategia multifase para potenciar respuestas inmunitarias celulares inducidas por inmunógenos. Se generaron secuencias consenso modificadas. También se desvelan modificaciones genéticas que incluyen optimización de codones, optimización de ARN y la adición de una secuencia líder de inmunoglobulina altamente eficaz. La nueva construcción se ha diseñado para inducir respuestas inmunitarias celulares más fuertes y más amplias que un inmunógeno de codones optimizados correspondiente.

Las vacunas HPV mejoradas se basan en proteínas y construcciones génicas que codifican proteínas con epítomos que las hacen particularmente eficaces como inmunógenos contra los que pueden inducirse anti-HPV. En consecuencia, las vacunas pueden inducir una respuesta inmunitaria terapéutica o profiláctica. En algunas realizaciones, el medio para suministrar el inmunógeno es una vacuna de ADN, una vacuna recombinante, una vacuna de subunidad proteica, una composición que comprende el inmunógeno, una vacuna atenuada o una vacuna muerta. En algunas realizaciones, la vacuna comprende una combinación seleccionada de los grupos que consisten en: una o más vacunas de ADN, una o más vacunas recombinantes, una o más vacunas de subunidades proteicas, una o más composiciones que comprenden el inmunógeno, una o más vacunas atenuadas y una o más vacunas muertas.

De acuerdo con algunas realizaciones, se suministra una vacuna a un individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del individuo y de este modo potenciar la respuesta inmunitaria contra HPV. Cuando se capta una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína por células del individuo la secuencia de nucleótidos se expresa en las células y la proteína se suministra por lo tanto al individuo. Se proporcionan métodos para suministrar las secuencias codificantes de la proteína en moléculas de ácidos nucleicos tales como plásmido, como parte de

vacunas recombinantes y como parte de vacunas atenuadas, como proteínas aisladas o proteínas parte de un vector.

Se proporcionan composiciones y métodos que inmunizan profiláctica y/o terapéuticamente a un individuo contra HPV.

Se unen operativamente a elementos reguladores composiciones para suministrar moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos de la invención que codifica el inmunógeno. Las composiciones pueden incluir un plásmido que codifica el inmunógeno, una vacuna recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el inmunógeno, un patógeno atenuado vivo que codifica una proteína de la divulgación y/o incluye una proteína de la divulgación; un patógeno muerto incluye una proteína de la divulgación; o una composición tal como un liposoma o vacuna subunitaria que comprende una proteína de la divulgación. Más composiciones relacionadas desveladas son composiciones farmacéuticas inyectables que comprenden composiciones.

SEQ ID NO: 1 comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un inmunógeno consenso de proteínas E6 y E7 de HPV 18. SEQ ID NO: 5 incluye SEQ ID NO: 1 y comprende además una secuencia líder de IgE unida a la secuencia de nucleótidos que codifica un inmunógeno consenso de proteínas E6 y E7 de HPV 18. SEQ ID NO: 2 comprende la secuencia de aminoácidos para el inmunógeno consenso de proteínas E6 y E7 de HPV 18. SEQ ID NO: 6 incluye SEQ ID NO: 2 y comprende además una secuencia líder de IgE unida a una secuencia de inmunógeno consenso. La secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 4 y puede codificarse por SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 7 es la secuencia de ácido nucleico del plásmido pGX302 con SEQ ID NO: 5 incorporado para expresión en el mismo.

En algunas realizaciones, las vacunas incluyen SEQ ID NO: 2, o una molécula de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, las vacunas incluyen SEQ ID NO: 1 como una molécula de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden preferentemente SEQ ID NO: 6 o una molécula de ácido nucleico que la codifica. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden preferentemente SEQ ID NO: 5 como una molécula de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden preferentemente SEQ ID NO: 7.

Los fragmentos de SEQ ID NO: 1 pueden comprender 90 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, los fragmentos de SEQ ID NO: 1 pueden comprender 180 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 270 o más nucleótidos; en algunas realizaciones 360 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 450 o más nucleótidos; en algunas realizaciones 540 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 630 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 720 o más nucleótidos; y en algunas realizaciones 770 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, los fragmentos de SEQ ID NO: 1 tales como los expuestos en el presente documento pueden comprender además secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunas realizaciones, los fragmentos de SEQ ID NO: 1 no comprenden secuencias codificantes para la secuencia líder de IgE. Los fragmentos de SEQ ID NO: 1 pueden comprender menos de 180 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 270 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 360 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 450 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 540 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 630 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 690 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 760 nucleótidos y en algunas realizaciones menos de 780 nucleótidos.

Los fragmentos de SEQ ID NO: 2 pueden comprender 30 o más aminoácidos. En algunas realizaciones, los fragmentos de SEQ ID NO: 2 pueden comprender 60 o más aminoácidos; en algunas realizaciones, 90 o más aminoácidos; en algunas realizaciones, 120 o más aminoácidos; en algunas realizaciones, 150 o más aminoácidos; en algunas realizaciones 180 o más aminoácidos; en algunas realizaciones, 210 o más aminoácidos; y en algunas realizaciones, 240 o más aminoácidos. Los fragmentos pueden comprender menos de 90 aminoácidos, en algunas realizaciones menos de 120 aminoácidos, en algunas realizaciones menos de 150 aminoácidos, en algunas realizaciones menos de 180 aminoácidos, en algunas realizaciones menos de 210 aminoácidos y en algunas realizaciones menos de 240 aminoácidos.

Todos los fragmentos de SEQ ID NO: 5 comprenden secuencias codificantes que codifican secuencias de HPV, es decir los fragmentos de SEQ ID NO: 5 deben comprender secuencias además de las que codifican el péptido líder de IgE. En algunas realizaciones, los fragmentos de SEQ ID NO: 5 comprenden 90 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, los fragmentos de SEQ ID NO: 5 pueden comprender 180 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 270 o más nucleótidos; en algunas realizaciones 360 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 450 o más nucleótidos; en algunas realizaciones 540 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 630 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 720 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 810 o más nucleótidos; y en algunas realizaciones, 830 o más nucleótidos. Los fragmentos de SEQ ID NO: 5 pueden comprender menos de 180 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 270 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 360 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 450 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 540 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 630 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 690

nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 720 nucleótidos, en algunas realizaciones menos de 780 nucleótidos, y en algunas realizaciones menos de 840 nucleótidos.

Los fragmentos de SEQ ID NO: 6 pueden comprender 30 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV. En algunas realizaciones, los fragmentos de SEQ ID NO: 6 pueden comprender 60 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV; en algunas realizaciones, 90 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV; en algunas realizaciones, 120 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV; en algunas realizaciones, 150 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV; en algunas realizaciones 180 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV; en algunas realizaciones, 210 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV; en algunas realizaciones, 240 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV; y en algunas realizaciones, 270 o más aminoácidos incluyendo secuencias de HPV. Los fragmentos pueden comprender menos de 90 aminoácidos incluyendo secuencias de HPV, en algunas realizaciones menos de 120 aminoácidos incluyendo secuencias de HPV, en algunas realizaciones menos de 150 aminoácidos incluyendo secuencias de HPV, en algunas realizaciones menos de 180 aminoácidos incluyendo secuencias de HPV, en algunas realizaciones menos de 210 aminoácidos incluyendo secuencias de HPV, en algunas realizaciones menos de 240 aminoácidos incluyendo secuencias de HPV, y en algunas realizaciones menos de 270 aminoácidos incluyendo secuencias de HPV.

De acuerdo con algunas realizaciones, los métodos para inducir una respuesta inmunitaria en individuos contra un inmunógeno comprenden administrar al individuo la secuencia de aminoácidos para el inmunógeno consenso de las proteínas E6 y E7 de HPV 18, o fragmentos funcionales de las mismas, o secuencias codificantes expresables de las mismas. Algunas realizaciones comprenden una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la secuencia de aminoácidos para el inmunógeno consenso de proteínas E6 y E7 de HPV 18, o un fragmento de la misma. Algunas realizaciones comprenden una vacuna recombinante que codifica la secuencia de aminoácidos para el inmunógeno consenso de proteínas E6 y E7 de HPV 18, o un fragmento de la misma. Algunas realizaciones comprenden una vacuna subunitaria que comprende la secuencia de aminoácidos para el inmunógeno consenso de proteínas E6 y E7 de HPV 18, o un fragmento de la misma. Algunas realizaciones comprenden una vacuna viva atenuada y/o una vacuna muerta que comprende la secuencia de aminoácidos para el inmunógeno consenso de proteínas E6 y E7 de HPV 18.

Las vacunas mejoradas comprenden proteínas y construcciones genéticas que codifican proteínas con epítomos que las hacen particularmente eficaces como inmunógenos contra los que pueden inducirse respuestas inmunitarias anti-HPV. En consecuencia, pueden proporcionarse vacunas para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica o profiláctica. En algunas realizaciones, el medio para suministrar el inmunógeno es una vacuna de ADN, una vacuna recombinante, una vacuna subunitaria proteica, una composición que comprende el inmunógeno, una vacuna atenuada o una vacuna muerta. En algunas realizaciones, la vacuna comprende una combinación seleccionada de los grupos que consisten en: una o más vacunas de ADN, una o más vacunas recombinantes, una o más vacunas subunitarias proteicas, una o más composiciones que comprenden el inmunógeno, una o más vacunas atenuadas y una o más vacunas muertas.

Los aspectos de la divulgación proporcionan métodos para suministrar las secuencias codificantes de la proteína o molécula de ácido nucleico tales como plásmido, como parte de vacunas recombinantes y como parte de vacunas atenuadas, como proteínas aisladas o parte de proteínas de un vector.

De acuerdo con algunos aspectos se proporcionan composiciones para su uso en métodos profilácticos y/o terapéuticos de inmunización de un individuo.

En las Patentes de Estados Unidos n.º 5.593.972, 5.739.118, 5.817.637, 5.830.876, 5.962.428, 5.981.505, 5.580.859, 5.703.055, 5.676.594, y en las solicitudes de prioridad citadas en las mismas, se describen vacunas de ADN. Además de los protocolos de suministro descritos en esas solicitudes, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.945.050 y 5.036.006 se describen métodos alternativos para suministrar ADN.

La presente divulgación se refiere a vacunas vivas atenuadas mejoradas, vacunas muertas mejoradas y vacunas mejoradas que usan vectores recombinantes para suministrar genes ajenos que codifican antígenos así como vacunas subunitarias y glucoproteicas. Se describen ejemplos de vacunas vivas atenuadas, las que usan vectores recombinantes para suministrar antígenos ajenos, vacunas subunitarias y vacunas glucoproteicas en las Patentes de Estados Unidos n.º: 4.510.245; 4.797.368; 4.722.848; 4.790.987; 4.920.209; 5.017.487; 5.077.044; 5.110.587; 5.112.749; 5.174.993; 5.223.424; 5.225.336; 5.240.703; 5.242.829; 5.294.441; 5.294.548; 5.310.668; 5.387.744; 5.389.368; 5.424.065; 5.451.499; 5.453.364; 5.462.734; 5.470.734; 5.474.935; 5.482.713; 5.591.439; 5.643.579; 5.650.309; 5.698.202; 5.955.088; 6.034.298; 6.042.836; 6.156.319 y 6.589.529.

Cuando una célula capta la construcción o las construcciones genéticas, estas pueden permanecer presentes en la célula como una molécula extracromosómica funcional y/o integrarse en el ADN cromosómico de la célula. Puede introducirse ADN en las células donde permanece como material genético separado en forma de un plásmido o plásmidos. Como alternativa, puede introducirse en la célula ADN lineal que puede integrarse en el cromosoma. Cuando se introduce ADN en la célula, pueden añadirse reactivos que promueven la integración de ADN en cromosomas. También pueden incluirse secuencias de ADN que son útiles para promover la integración en la molécula de ADN. Como alternativa, puede administrarse ARN a la célula. También se contempla proporcionar la

construcción genética como un minicromosoma lineal que incluye un centrómero, telómeros y un origen de replicación. Las construcciones génicas pueden permanecer como parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que viven en células. Las construcciones génicas pueden ser parte de genomas de vacunas virales recombinantes donde el material genético se integra en el cromosoma de la célula o permanece extracromosómico. Las construcciones genéticas incluyen elementos reguladores necesarios para expresión génica de una molécula de ácido nucleico. Los elementos incluyen: un promotor, un codón de inicio, en codón de terminación y una señal de poliadenilación. Además, se requieren con frecuencia potenciadores para expresión génica de la secuencia que codifica la proteína diana o la proteína inmunomoduladora. Es necesario que estos elementos se unan operativamente con la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos reguladores sean operativos en el individuo al que se administran.

Los codones de inicio y el codón de terminación se consideran en general parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína deseada. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en el individuo al que se administra la construcción génica. Los codones de inicio y terminación deben estar en fase con la secuencia codificante.

Los promotores y las señales de poliadenilación usados deben ser funcionales dentro de las células del individuo.

Los ejemplos de promotores útiles para practicar la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen pero sin limitación, promotores de Virus de Simio 40 (SV40), Promotor de Virus de Tumor Mamario de Ratón (MMTV), Virus de Inmunodeficiencia Humana (MV) tal como el promotor de Repetición Terminal Larga (LTR) de BIV, virus de Moloney, ALV, Citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de CMV, Virus de Epstein Barr (EBV), Virus de Sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como Actina humana, Miosina humana, Hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana.

Los ejemplos de señales de poliadenilación útiles para practicar la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen pero sin limitación señales de poliadenilación de SV40 y señales de poliadenilación de LTR. En particular, se usa la señal de poliadenilación de SV40 que está en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego CA), denominada la señal de poliadenilación SV40.

Además de los elementos reguladores requeridos para expresión de ADN, también pueden incluirse otros elementos en la molécula de ADN. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede seleccionarse del grupo que incluye pero sin limitación: Actina humana, Miosina humana, Hemoglobina humana, creatina muscular humana y potenciadores virales tales como los de CMV, RSV y EBV.

Pueden proporcionarse construcciones genéticas con origen de replicación de mamífero para mantener la construcción extracromosómicamente y producir múltiples copias de la construcción en la célula. Los plásmidos pVAX1, pCEP4 y pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA) contienen el origen de replicación del virus de Epstein Barr y la región codificante de antígeno nuclear EBNA-1 que produce replicación episómica de alto número de copias sin integración.

En algunas realizaciones preferidas relacionadas con aplicaciones de inmunización, se suministran una molécula o moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos de la invención que codifican proteína de la divulgación y, adicionalmente, genes para proteínas que potencian adicionalmente la respuesta inmunitaria contra dichas proteínas diana. Son ejemplos de dichos genes los que codifican otras citocinas y linfocinas tales como interferón alfa, interferón gamma, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MHC, CD80, CD86 e IL-15 incluyendo IL-15 que tiene la secuencia señal suprimida y opcionalmente incluyendo el péptido señal de IgE. Otros genes que pueden ser útiles incluyen los que codifican: MCP-1, MIP-1 α , MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK Inactivo, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta a interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos.

Puede añadirse un elemento adicional que actúa como una diana para destrucción celular si es deseable eliminar células que reciban la construcción genética por cualquier razón. Puede incluirse en la construcción genética un gen de timidina quinasa (tk) de herpes en una forma expresable. El fármaco ganciclovir puede administrarse al individuo y ese fármaco provocará la destrucción selectiva de cualquier célula que produzca tk, proporcionando, por lo tanto, el medio para la destrucción selectiva de células con la construcción genética.

Para maximizar la producción de proteínas, pueden seleccionarse secuencias reguladoras que están bien adaptadas para expresión génica en las células a la que se administra la construcción. Además, pueden seleccionarse codones que se transcriben más eficazmente en la célula. Un experto habitual en la técnica puede producir construcciones de ADN que son funcionales en las células.

En algunas realizaciones, pueden proporcionarse construcciones génicas en las que las secuencias codificantes para las proteínas descritas en el presente documento están unidas al péptido señal de IgE. En algunas realizaciones, las proteínas descritas en el presente documento se unen al péptido señal de IgE.

En algunas realizaciones para las que se usa proteína, por ejemplo, un experto habitual en la materia, usando técnicas bien conocidas, puede producir y aislar proteínas de la divulgación usando técnicas bien conocidas. En algunas realizaciones para las que se usa proteína, por ejemplo, un experto en la materia, usando técnicas bien conocidas, puede insertar moléculas de ADN que codifican una proteína de la divulgación en un vector de expresión disponible en el mercado para su uso en sistemas de expresión bien conocidos. Por ejemplo, el plásmido disponible en el mercado pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede usarse para producción de proteína en *E. coli*. El plásmido disponible en el mercado pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede, por ejemplo, usarse para producción en cepas de levadura *S. cerevisiae*. El sistema de expresión de baculovirus completo MAXBAC™ disponible en el mercado (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede, por ejemplo, usarse para producción en células de insecto. El plásmido disponible en el mercado pcDNA1 o pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede, por ejemplo, usarse para producción en células de mamífero tales como células de Ovario de Hámster Chino. Un experto habitual en la materia puede usar estos vectores de expresión comerciales y sistemas u otros para producir proteína por técnicas rutinarias y materiales de partida disponibles fácilmente. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning a Laboratory Manual, Segunda Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)). Por lo tanto, las proteínas deseadas pueden prepararse en sistemas tanto procariotas como eucariotas, dando como resultado un espectro de formas procesadas de la proteína.

Un experto habitual en la materia puede usar otros vectores de expresión y sistemas disponibles en el mercado o producir vectores usando métodos bien conocidos y materiales de partida fácilmente disponibles. Los sistemas de expresión que contienen las secuencias de control requeridas, tales como promotores y señales de poliadenilación, y preferentemente potenciadores, están fácilmente disponibles y se conocen en la técnica para una diversidad de hospedadores. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning a Laboratory Manual, Segunda Ed. Cold Spring Harbor Press (1989). Las construcciones genéticas incluyen la secuencia codificante de proteínas unida operativamente con un promotor que es funcional en la línea celular en la que se transfectan las construcciones. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen promotores de citomegalovirus o SV40. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen promotores de metalotioneína o virus de leucemia mamaria de ratón. Los expertos habituales en la materia pueden producir fácilmente construcciones genéticas útiles para transfectar células con ADN que codifica proteína de la divulgación a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. El vector de expresión que incluye el ADN que codifica la proteína se usa para transformar el hospedador compatible que después se cultiva y mantiene en condiciones en las que tiene lugar la expresión del ADN ajeno.

La proteína producida se recupera del cultivo, bien lisando las células o bien a partir de medio de cultivo según sea apropiado y conocido por los expertos en la materia. Un experto habitual en la materia puede, usando técnicas bien conocidas, aislar una proteína que se produce usando dichos sistemas de expresión. Los métodos para purificar proteína de fuentes naturales usando anticuerpos que se unen específicamente a una proteína específica como se ha descrito anteriormente pueden aplicarse igualmente para purificar proteína producida por metodología de ADN recombinante.

Además de producir proteínas por técnicas recombinantes, también pueden emplearse sintetizadores de péptidos automáticos para producir proteína esencialmente pura, aislada. Dichas técnicas se conocen bien por los expertos habituales en la materia y son útiles si no se proporcionan derivados que tengan sustituciones en la producción de proteínas codificadas por ADN.

Las moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse usando cualquiera de varias tecnologías bien conocidas incluyendo inyección de ADN (también denominada vacunación de ADN), vectores recombinantes tales como adenovirus recombinante, virus asociado a adenovirus recombinante y virus variolovacunal recombinante.

Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraocular y oral así como tópica, transdérmica, por inhalación o supositorio o al tejido de la mucosa tal como mediante lavado a tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual. Las vías de administración preferidas incluyen inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica y subcutánea. Pueden administrarse construcciones genéticas por medios que incluyen, pero sin limitación, métodos y dispositivos de electroporación, jeringas tradicionales, dispositivos de inyección sin agujas o "pistolas de bombardeo de microproyectiles".

Los ejemplos de dispositivos de electroporación y métodos de electroporación preferidos para facilitar el suministro de las vacunas de ADN incluyen los descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 7.245.963 de Draghia-Akli, *et al.*,

Publicación de Patente de Estados Unidos 2005/0052630 presentada por Smith, *et al.* También se prefieren dispositivos de electroporación y métodos de electroporación para facilitar el suministro de las vacunas de ADN proporcionadas en la Patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente y del mismo propietario que la presente n.º US2008 0091135 presentada el 17 de octubre de 2007, que reivindica el beneficio según 35 USC 119(e) de las Solicitudes Provisionales de Estados Unidos n.º de Serie 60/852.149, presentada el 17 de octubre de 2006 y 60/978.982, presentada el 10 de octubre de 2007.

Lo siguiente es un ejemplo de una realización que usa tecnología de electroporación, y se analiza en más detalle en las referencias de patente analizadas anteriormente: pueden configurarse dispositivos de electroporación para suministrar a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía que produce una corriente constante similar a una corriente preestablecida introducida por un usuario. El dispositivo de electroporación comprende un componente de electroporación y un sistema de electrodos o palanca equipada. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, incluyendo: controlador, generador de forma de ondas de corriente, controlador de impedancia, registrador de forma de onda, elemento de entrada, elemento indicador de estado, puerto de comunicaciones, componente de memoria, fuente de alimentación e interruptor de alimentación. El componente de electroporación pueda actuar como un elemento de los dispositivos de electroporación, y los otros elementos son elementos separados (o componentes) en comunicación con el componente de electroporación. En algunas realizaciones, el componente de electroporación puede actuar como más de un elemento de los dispositivos de electroporación, que puede estar en comunicación con otros elementos más de los dispositivos de electroporación separados del componente de electroporación. El uso de tecnología de electroporación para suministrar la vacuna de HCV mejorada no está limitado por los elementos de los dispositivos de electroporación existentes como parte de un dispositivo electromecánico o mecánico, ya que los elementos puedan actuar como un dispositivo o como elementos separados en comunicación entre sí. El componente de electroporación es capaz de suministrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado e incluye un mecanismo de retroalimentación. El sistema de electrodos incluye una guía de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos en una disposición espacial, en la que el sistema de electrodos recibe el pulso de energía del componente de electroporación y lo suministra al tejido deseado a través de los electrodos. Al menos uno de la pluralidad de electrodos es neutro durante el suministro del pulso de energía y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de energía suministrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante.

En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos puede suministrar el pulso de energía en un patrón descentralizado. En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos puede suministrar el pulso de energía en el patrón descentralizado a través del control de los electrodos en una secuencia programada, y la secuencia programada se introduce por un usuario en el componente de electroporación. En algunas realizaciones, la secuencia programada comprende una pluralidad de pulsos suministrados en secuencia, en la que cada pulso de la pluralidad de pulso se suministra por al menos dos electrodos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia, y en la que un pulso posterior de la pluralidad de pulsos se suministra por un electrodo diferente de al menos dos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia.

En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación se realiza por hardware o software. Preferentemente, el mecanismo de retroalimentación se realiza por un circuito de bucle cerrado análogo. Preferentemente, esta retroalimentación sucede cada 50 μ s, 20 μ s, 10 μ s o 1 μ s, pero es preferentemente una retroalimentación en tiempo real o instantánea (es decir, sustancialmente instantánea como se determina por técnicas disponibles para determinar el tiempo de respuesta). En algunas realizaciones, el electrodo neutro mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al mecanismo de retroalimentación, y el mecanismo de retroalimentación responde a la impedancia y ajusta el pulso de energía para mantener la corriente constante a un valor similar a la corriente preestablecida. En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación mantiene la corriente constante de forma continua e instantáneamente durante el suministro del pulso de energía.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se suministra a las células junto con administración de un potenciador de la función del polinucleótido o un agente facilitador de vacuna genética. Se describen potenciadores de la función de polinucleótido en Número de Serie de Estados Unidos 5.593.972, 5.962.428 y Solicitud Internacional WO94/16737 presentada el 26 de enero de 1994. Se describen agentes facilitadores de vacuna genética en el Número de Serie de Estados Unidos 021.579 presentado el 1 de abril de 1994. Los co-agentes que se administran junto con moléculas de ácido nucleico pueden administrarse como una mezcla con la molécula de ácido nucleico o administrarse por separado simultáneamente, antes o después de la administración de las moléculas de ácido nucleico. Además, pueden co-administrarse otros agentes que pueden actuar como agentes de transfección y/o agentes de replicación y/o agentes inflamatorios y que pueden coadministrarse con un GVF incluyen factores de crecimiento, citocinas y linfocinas tales como interferón α , interferón gamma, GM-CSF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15, así como factor de crecimiento de fibroblastos, agentes tensioactivos tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS incluyendo monofosforil Lípido a (WL), péptidos de muramilo, análogos de quinona y vesículas tales como escualeno y escualeno, y ácido hialurónico también pueden usarse administrados junto con la construcción genética. En algunas realizaciones, una proteína inmunomoduladora

puede usarse como un GVF. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se proporciona en asociación con PLG para potenciar el suministro/la captación.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 2000 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 5 nanogramos a aproximadamente 1000 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 10 nanogramos a aproximadamente 800 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 microgramos de ADN.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se formulan de acuerdo con el modo de administración para usar. En casos en los que las composiciones farmacéuticas sean composiciones farmacéuticas inyectables, serán estériles, sin pirógenos y sin partículas. Se usa preferentemente una formulación isotónica. En general, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizadores incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente de vasoconstricción a la formulación.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención se proporcionan ácidos nucleicos y vacunas para uso en métodos de inducción de respuestas inmunitarias. La vacuna puede ser una vacuna viva atenuada que comprende un ácido nucleico de la invención, una vacuna recombinante o una vacuna de ácido nucleico o ADN. En algunas realizaciones, los métodos para inducción de una respuesta inmunitaria en individuos contra un inmunógeno, incluyendo métodos para inducir respuestas inmunitarias de la mucosa, comprenden administrar al individuo uno o más de proteína CTACK, proteína TECK, proteína MEC y fragmentos funcionales de las mismas o secuencias codificantes expresables de las mismas en combinación con una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que codifica una proteína de la divulgación y/o una vacuna recombinante que codifica una proteína de la divulgación y/o una vacuna subunitaria que codifica una proteína de la divulgación y/o una vacuna viva atenuada y/o una vacuna muerta. Las una o más de proteína CTACK, proteína TECK, proteína MEC y fragmentos funcionales de las mismas pueden administrarse antes de, simultáneamente con o después de la administración de la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un inmunógeno; y/o vacuna recombinante que codifica un inmunógeno y/o una vacuna subunitaria que comprende un inmunógeno y/o vacuna viva atenuada y/o vacuna muerta. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: CTACK, TECK, MEC y fragmentos funcionales de las mismas se administra al individuo.

La presente invención se ilustra además en el siguiente Ejemplo.

EJEMPLO

Se prepararon secuencias consenso optimizadas para proteínas virales E6 y 7 del virus del papiloma humano 18 (HPV). La secuencia se diseña para altos niveles de expresión. Esta secuencia es útil en la tecnología de inmunización genética de los inventores. Los resultados de experimentos realizados usando la secuencia consenso fueron positivos. La Figura 1 proporciona una descripción de la construcción plasmídica que incluye la secuencia de ácido nucleico del HPV 18-6 y 7 consenso en el plásmido pGX3002 (SEQ ID NO: 7). La secuencia de ácido nucleico del HPV 18-6 y 7 consenso que se incorpora en el plásmido pGX3002 incluye secuencia codificante para el péptido líder de IgE unido a las secuencias codificantes del HPV 18-6 y 7 consenso.

El plásmido pGX3002 expresa los antígenos 6 y 7 de virus del papiloma humano 18 (HPV 18 E6 y 7), optimizados, conducidos por el promotor de CMV (pCMV) con el extremo 3' de hormona del crecimiento bovina y señal de poliadenilación (bGHpA) usando una cadena principal de pVAX que incluye el gen de resistencia a kanamicina (Kan) y origen de replicación plasmídico (ori pUC).

Elementos:	Pares de Bases
Promotor de CMV:	137-724
Secuencia codificante de HPV 18-6 y 7	754-1606
PoliA de bGH:	1640-1879
Resistencia a Kan:	2052-2846
Ori pUC:	3145-3818

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania Weiner, David B Yan, Jian

<120> VACUNAS MEJORADAS PARA EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y MÉTODOS PARA USARLAS

	<130> 133172.02700	
5	<150> US 61/146.942 <151> 23-01-2009	
	<150> US 12/691.588 <151> 21-01-2010	
10	<160> 7	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1 <211> 783 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Secuencia consenso de HPV que codifica E6 y E7	
	<400> 1	
	gccagattcg aggacccac caggagcggc tacaagctgc ccgatctgtg taccgagctg	60
	aacaccagcc tgcaggacat cgagatcacc tgttgtgtact gtaagaccgt gctggagctg	120
	accgaggtgt tcgagaagga cctgttcgtg gtgtacaggg acagcatccc ccacgccgcc	180
	tgccacaagt gtatcgactt ctacagccgg atccgggagc tgagacacta cagcgacagc	240
	gtgtacggcg ataccctgga gaagctgacc aacaccggcc tgtacaacct gctgatccgg	300
	tgcctgagat gccagaagcc cctgctgaga cacctgaacg agaagcggcg gtccacaac	360
	atcgccggcc actacagagg ccagtgccac agctgctgta acagggccag gcaggagaga	420
	ctgcagcgga gaagagagac ccaggtgagg ggcaggaaga gaagaagcca cggccccaag	480
	gccaccctgc aggatatcgt gctgcacctg gagccccaga atgagatccc cgtggatctg	540
	ctgggccacg gccagctgtc cgacagcgag gaggagaacg acgagatcga cggcgtgaat	600
	caccagcacc tgcctgccag aagagccgag cctcagaggc acaccatgct gtgtatgtgc	660
	tgtaatgtgt aggcccgat cgaactggtg gtggagagca gcgccgacga cctgagagcc	720
	ttccagcagc tgttcctgaa caccctgagc ttcgtgtgtc cttggtgtgc cagccagcag	780
	tga	783
25	<210> 2 <211> 260 <212> PRT <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Secuencia peptídica de HPV consenso con E6 y E7	
35	<400> 2	

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

ES 2 592 204 T3

	225		230		235		240									
	Phe	Gln	Gln	Leu	Phe	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Phe	Val	Cys	Pro	Trp	Cys
				245					250						255	
	Ala	Ser	Gln	Gln												
				260												
5	<210>	3														
	<211>	54														
	<212>	ADN														
	<213>	Secuencia Artificial														
10	<220>															
	<223>	Secuencia de ADN líder de IgE														
	<400>	3														54
		atggactgga cctggatcct gttcctggtg gccgctgccca cacgggtgca cagc														
15	<210>	4														
	<211>	18														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
20	<220>															
	<223>	Secuencia peptídica líder de IgE														
	<400>	4														
	Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Val
	1				5					10					15	
25	His	Ser														
	<210>	5														
	<211>	837														
	<212>	ADN														
30	<213>	Secuencia Artificial														
	<220>															
	<223>	Transgén de secuencia de ácido nucleico de HPV consenso que incluye IgE														
35	<400>	5														

ES 2 592 204 T3

```

atggactgga cctggatcct gttcctggtg gccgctgcc aacgggtgca cagcggcaga      60
ttcgaggacc ccaccaggag cggctacaag ctgcccgatc tgtgtaccga gctgaacacc      120
agcctgcagg acatcgagat cacctgtgtg tactgtaga ccgtgctgga gctgaccgag      180
gtgttcgaga aggacctgtt cgtggtgtac agggacagca tccccacgc cgctgccac      240
aagtgtatcg acttctacag ccggatccgg gagctgagac actacagcga cagcgtgtac      300
ggcgataccc tggagaagct gaccaacacc ggctgtaca acctgctgat ccggtgcctg      360
agatgccaga agccctgct gagacacctg aacgagaagc ggcggttcca caacatcgcc      420

ggccactaca gaggccagtg ccacagctgc tgtaacaggg ccaggcagga gagactgcag      480
cggagaagag agaccaggtg gaggggcagg aagagaagaa gccacggccc caaggccacc      540
ctgcaggata tcgtgctgca cctggagccc cagaatgaga tccccgtgga tctgctgggc      600
cacggccagc tgtccgacag cgaggaggag aacgacgaga tcgacggcgt gaatcaccag      660
cacctgcctg ccagaagagc cgagcctcag aggcacacca tgctgtgtat gtgctgtaag      720
tgtgagggcc ggatcgaact ggtggtggag agcagcgccg acgacctgag agccttccag      780
cagctgttcc tgaacaccct gagcttcgtg tgccttggt gtgccagcca gcagtga      837

```

<210> 6
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica HPV consenso con péptido líder IgE
 <400> 6

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Val
1				5					10					15	
His	Ser	Ala	Arg	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	Gly	Tyr	Lys	Leu	Pro
			20					25					30		
Asp	Leu	Cys	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr
		35					40					45			
Cys	Val	Tyr	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Lys
	50					55					60				
Asp	Leu	Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	His	Ala	Ala	Cys	His
65					70					75				80	
Lys	Cys	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ser	Arg	Ile	Arg	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Ser
			85						90					95	
Asp	Ser	Val	Tyr	Gly	Asp	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Leu
			100					105					110		
Tyr	Asn	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Arg
	115						120					125			
His	Leu	Asn	Glu	Lys	Arg	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Ala	Gly	His	Tyr	Arg
	130					135					140				
Gly	Gln	Cys	His	Ser	Cys	Cys	Asn	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln

145		150		155		160
Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser His Gly						
		165		170		175
Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn						
		180		185		190
Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Gly His Gly Gln Leu Ser Asp Ser Glu						
		195		200		205
Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala						
		210		215		220
Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys						
		225		230		235
Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu						
		245		250		255
Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro						
		260		265		270
Trp Cys Ala Ser Gln Gln						
		275				

<210> 7
 <211> 3824
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Plásmido pGX3002 con líder IgE y consenso

<400> 7

gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta	60
atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata	120
acttacggta aatggcccgcc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat	180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga	240
gtattttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc	300
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcttgccat tatgcccagt acatgacctt	360
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat	420
gcggtttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag	480
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc	540
aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga	600

ggctctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga	660
aattaatacag actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggg	720
accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaaattcgc caccatggac tggacctgga	780
tcctgttctt ggtggccgct gccacacggg tgcacagcgc cagattcgag gacccacca	840
ggagcggcta caagctgccc gatctgtgta ccgagctgaa caccagcctg caggacatcg	900
agatcacctg tgtgtactgt aagaccgtgc tggagctgac cgagggtgtc gagaaggacc	960
tgttcgtggg gtacagggac agcatcccc acgccgcctg ccacaagtgt atcgacttct	1020
acagccggat ccgggagctg agacactaca gcgacagcgt gtacggcgat accctggaga	1080
agctgaccaa caccggcctg tacaacctgc tgatccggtg cctgagatgc cagaagcccc	1140
tgctgagaca cctgaacgag aagcggcggg tccacaacat cgcgggccac tacagaggcc	1200
agtgcacag ctgctgtaac agggccaggc aggagagact gcagcggaga agagagaccc	1260
aggtgagggg caggaagaga agaagccacg gcccgaaggc caccctgcag gatatcgtgc	1320
tgcacctgga gcccagaat gagatcccc tggatctgct gggccacggc cagctgtccg	1380
acagcgagga ggagaacgac gagatcgacg gcgtgaatca ccagcacctg cctgccagaa	1440
gagccgagcc tcagaggcac accatgctgt gtatgtgctg taagtgtgag gcccggatcg	1500
aactggtggg ggagagcagc gccgacgacc tgagagcctt ccagcagctg ttcctgaaca	1560
ccctgagctt cgtgtgtcct tgggtgtgcca gccagcagtg atgagcggcc gctcgagtct	1620
agagggcccc tttaaacccg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct	1680
gttgtttgcc cctccccgt gccctccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt	1740
tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcacat tgtctgagta ggtgtcattc tattctggg	1800
ggtggggtgg ggcagacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg	1860
gatgcggtgg gctctatggc ttctactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat	1920
tgccagctgg ggcgcctct ggtaaggttg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt	1980
tcttgccgcc aaggatctga tggcgaggg gatcaagctc tgatcaagag acaggatgag	2040
gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg	2100
agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt	2160
tccggctgtc agcgcagggg cgcgcggttc tttttgtcaa gaccgacctg tccgggtgcc	2220
tgaatgaact gcaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt	2280
gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag	2340
tgcgggggca ggatctcctg tcactctacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg	2400
ctgatgcaat gcggcggctg catacgttg atccggctac ctgccattc gaccaccaag	2460

cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg	2520
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcga	2580
gcatgccccga cggcgaggat ctcgctgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca	2640
tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca tgcactgtgg ccggctgggt gtggcggacc	2700
gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga agagcttggc ggcgaaatggg	2760
ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttgcagcgc atcgccctct	2820
atcgccctct tgacgagttc ttctgaatta ttaacgctta caatttcctg atgcggtatt	2880
ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatcag gtggcacttt tcggggaaat	2940
gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg	3000
agacaataac cctgataaat gcttcaataa tagcacgtgc taaaacttca tttttaattt	3060
aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag	3120
ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct	3180
ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt	3240
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg	3300
cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct	3360
gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc	3420
gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg	3480
tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag ccagccttg agcgaacgac ctacaccgaa	3540
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg	3600
gacaggatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg	3660
ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga	3720
tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt	3780
ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctt	3824

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en la que dicha molécula es un plásmido.
3. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 10 4. Una vacuna recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
5. La vacuna recombinante de la reivindicación 4 en la que dicha vacuna recombinante es una vacuna variolovacunal recombinante.
- 15 6. Una vacuna viva atenuada que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
7. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, o la vacuna recombinante de la reivindicación 4 o reivindicación 5, o la vacuna viva atenuada de la reivindicación 6 para uso en la vacunación de un individuo contra HPV.
- 20 8. La molécula de ácido nucleico para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha molécula de ácido nucleico es para introducción en el individuo por electroporación.
- 25 9. La molécula de ácido nucleico, vacuna recombinante o vacuna viva atenuada para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en la que se ha diagnosticado al individuo infección por HPV.

FIGURA 1**VGX 3100 (parte) – código de plásmido interno pGX3002-HPV18-6y7**

El plásmido que expresa los antígenos 6 y 7 del virus del papiloma humano 18 (HPV18E6y7), conducido por el promotor de CMV (pCMV) con el extremo 3' de hormona de crecimiento bovina y señal de poliadenilación (bGHpA); la cadena principal de pVAX incluye el gen de resistencia a kanamicina (Kan) y el origen de replicación plasmídico (ori pUC).

Elementos:	Pares de bases
Promotor de CMV:	137-724
Secuencia codificante de HPV 18-6y7:	754-1606
PoliA de bGH	1649-1879
Resistencia a Kan:	2052-2846
Ori pUC:	3145-3818

