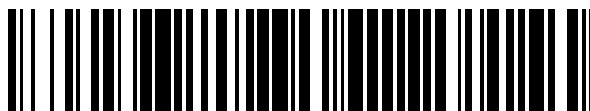


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 597**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2010 PCT/US2010/031460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10121180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2010 E 10715632 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2419126**

54 Título: **Composiciones inmunoterápicas de combinación contra el cáncer y métodos**

30 Prioridad:

17.04.2009 US 170530 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2018

73 Titular/es:

**GLOBEIMMUNE, INC. (50.0%)
1450 Infinite Drive
Louisville, CO 80027, US y
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**HODGE, JAMES;
SCHLOM, JEFFREY y
FRANZUSOFF, ALEX**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 660 597 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

Composiciones inmunoterápicas de combinación contra el cáncer y métodos

5 Derechos del Gobierno

La presente invención se creó en la ejecución de un Acuerdo Cooperativo de Investigación y Desarrollo con los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU., una Agencia del Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la presente invención.

10

Declaración con respecto al Acuerdo de Investigación Conjunto

La presente invención se realizó por, o en nombre de las partes, en un Acuerdo Cooperativo de Investigación y Desarrollo, ejecutado el 8 de mayo de 2008. Las partes en el Acuerdo Cooperativo de Investigación y Desarrollo son: Globelmmune, Inc. y el Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., representado por el Instituto Nacional contra el Cáncer, un Instituto, Centro o División de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU.

15

Referencia a un listado de secuencias

20

La presente solicitud contiene una lista de secuencias presentada electrónicamente en forma de un archivo de texto por EFS-Web. El archivo de texto, denominado "3923-24-PCT_ST25", tiene un tamaño en bytes de 47 KB y se grabó el 16 de abril de 2010.

25 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al uso simultáneo de dos composiciones inmunoterápicas diferentes para la inducción mejorada de respuestas inmunitarias terapéuticas y/o para la prevención, la mejora y/o el tratamiento de una enfermedad, incluyendo, pero no limitada a, el cáncer y enfermedades infecciosas.

30

Antecedentes de la invención

Las composiciones inmunoterápicas, incluidas las vacunas, son una de las medidas más rentables disponibles para la industria del cuidado de la salud para la prevención y tratamiento de enfermedades. Sigue existiendo, sin embargo, una necesidad urgente de desarrollar estrategias y adyuvantes de inmunoterapia seguros y eficaces para una diversidad de enfermedades, incluyendo las provocadas por o asociadas a la infección por agentes patógenos, cánceres, defectos genéticos y otros trastornos del sistema inmunitario. Para el tratamiento del cáncer y muchas enfermedades infecciosas, incluyendo enfermedades víricas y enfermedades provocadas por patógenos intracelulares, es deseable proporcionar inmunoterapia que induzca una respuesta inmunitaria mediada por células (celular), aunque muchas vacunas se dirigen principalmente o enteramente a la inducción de inmunidad humoral. De hecho, una desventaja de muchas vacunas de subunidades, así como muchas vacunas de patógenos inactivados o atenuados, es que mientras que parecen estimular una fuerte respuesta inmunitaria humoral, no logran inducir una inmunidad protectora mediada por células.

35

40

45

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo y el desarrollo de terapias eficaces contra el cáncer sigue siendo una de las áreas más activas de la investigación. Aunque se ha propuesto una diversidad de enfoques innovadores para tratar y prevenir los cánceres, muchos cánceres siguen teniendo una alta tasa de mortalidad y pueden ser difíciles de tratar o relativamente insensibles a las terapias convencionales. Descubrimientos novedosos en la biología del cáncer han proporcionado la oportunidad de diseñar agentes antineoplásicos específicos de diana y han propiciado avances en el desarrollo de fármacos y de la inmunoterapia. Estos descubrimientos hacen posible el diseño de moléculas y composiciones terapéuticas con una alta selectividad contra dianas específicas en las células cancerosas.

50

Se han publicado numerosos estudios de inmunoterapia que comparan plataformas de vacunas que se dirigen al mismo antígeno, en términos de su capacidad para inducir la actividad celular inmunitaria y efectos antitumorales (por ejemplo, véase Weide et al., *Immunol Lett*, 15 de enero de 2008; 115 (1): 33-42; Riezebos-Brilman et al., *Gene Ther*, diciembre de 2007; 14 (24): 1695-704; Naslund et al., *J Immunol*, 1 de junio de 2007; 178 (11): 6761-9; Mylin et al., *J Virol*, agosto de 2000; 74 (15): 6922-34; Millar et al., *Cell Immunol*, noviembre-diciembre de 2007; 250 (1-2): 55-67; Hodge et al., *Cancer Res*, 15 de noviembre de 2003; 63 (22): 7942-9; Chan et al., *Gene Ther*, octubre de 2006; 13 (19): 1391-402; Casimiro et al., *J Virol*, junio de 2003; 77 (11): 6305-13; y Bos et al., *J Immunol*, 1 de noviembre de 2007; 179 (9): 6115-22). Millar et al. demostraron que la funcionalidad de poblaciones de linfocitos T inducidas por dos vectores diferentes (rV y adenovirus recombinante) dirigidas al mismo antígeno no fue diferente (Millar et al., *Cell Immunol*, noviembre-diciembre de 2007; 250 (1-2): 55-67).

55

60

65

La eficacia antitumoral de la pauta de vacunas de sensibilización y de refuerzo diversificadas de los virus variolovacunal recombinante (rV) y de la viruela aviar recombinante (rF) que contienen genes murinos B7-1, ICAM-1

y LFA-3, así como el gen del antígeno carcinoembrionario humano (CEA) (rV/F-CEA/TRICOM) se ha notificado anteriormente en modelos preclínicos (Hodge et al., *Cancer Res*, 15 de noviembre de 2003; 63 (22): 7942-9; Hodge et al., *Cancer Res*, 15 de noviembre de 1999; 59 (22): 5800-7; Hodge et al., *Clin Cancer Res*, mayo de 2003; 9 (5): 1837-1849; Grosenbach et al., *Cancer Res*, 1 de junio de 2001; 61 (11): 4497-505; Greiner et al., *Cancer Res*, 1 de diciembre de 2002; 62 (23): 6944-51; Arlen et al., *Crit Rev Immunol* 2007; 27 (5):451-62). Recientemente, los efectos antitumorales de una vacuna de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante (levadura-CEA) también se documentados en modelos preclínicos (Bernstein et al., *Vaccine*, 24 de enero de 2008; 26 (4): 509-21; Wansley et al., *Clin Cancer Res*, 1 de julio de 2008; 14 (13):4316-25). La inducción de la respuesta inmunitaria después de la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA se ha documentado y los efectos antitumorales desencadenados por cualquiera de las vacunas se atribuyen principalmente a la inducción de poblaciones de linfocitos T específicos de CEA.

Varios estudios han documentado que la inducción de una población de linfocitos T más diversa es ventajosa en el montaje de una respuesta inmunitaria en diversos modelos de enfermedad, incluyendo el cáncer (Dudley et al., *Cancer J*, marzo-abril 2000; 6 (2): 69-77; Dutoit et al., *Cancer Res*, 1 de agosto de 2001; 61 (15): 5850-6; Echchakir et al., *Int Immunol*, abril de 2000; 12 (4): 537-46; Ferradini et al., *Cancer Res*, 1 de septiembre de 1992; 52 (17): 4649-54; Messaoudi et al., *Science*, 29 de noviembre de 2002; 298 (5599): 1797-800; Nikolich-Zugich et al., *Nat Rev Immunol*, febrero de 2004; 4 (2): 123-32; Sportes et al., *J Exp Med*, 7 de julio de 2008; 205 (7): 1701-1714; Zhou et al., *Cancer Res*, 1 de febrero de 2005; 65 (3):1079-88). Sin embargo, no existen informes del uso simultáneo de las vacunas que se dirigen al mismo antígeno. Después de los estudios dirigidos al mismo antígeno, tales como los descritos anteriormente, los investigadores históricamente eligen ya sea la vacuna más eficaz para el estudio adicional o emplean una estrategia de sensibilización y refuerzo diversificada para amplificar la respuesta de los linfocitos T. Por ejemplo, se empleó una estrategia de vacunación de sensibilización-refuerzo diversificada con vectores de virus variolovacunal y de viruela aviar recombinantes dirigidos a CEA (Hodge et al., *Vaccine*, abril-mayo de 1997; 15 (6-7): 759-68; Marshall et al., *J Clin Oncol*, 1 de diciembre de 2000; 18 (23): 3964-73), porque se ha demostrado que la respuesta inmunitaria a la primera vacuna reduce los efectos de las vacunaciones posteriores con el mismo vector (Naslund et al., 2007, citado anteriormente; Grosenbach et al., 2001, citado anteriormente; Hodge et al., 1997, citado anteriormente y Wu et al., *J Virol*, julio de 2005; 79 (13): 8024-31). Resultados similares que demuestran las claras ventajas de una estrategia de sensibilización-refuerzo diversificada se han descrito en una diversidad de modelos de cáncer y otras enfermedades, incluyendo el VIH y la malaria (Wu et al., 2005, citado anteriormente; Pancholi et al., *J Infect Dis*, julio de 2000.; 182 (1): 18-27; Barnett et al., *AIDS Res Hum Retroviruses*, octubre de 1998; 14 Supl. 3: S299-309; Dunachie et al., *J Exp Biol*, noviembre de 2003; 206 (Pt 21): 3771-9; McMichael, *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 227-55; Moore et al., *Immunol Rev*, junio de 2004; 199:126-43). Las respuestas potenciadas observadas en estos estudios se han atribuido a la amplificación de la población pertinente de linfocitos T específicos de antígeno, pero de nuevo, se usó un enfoque de sensibilización-refuerzo diversificado para conseguir estos resultados.

En consecuencia, a pesar de los avances en la terapia contra el cáncer y la tecnología de inmunoterapia/vacuna contra enfermedades infecciosas, sigue existiendo una necesidad urgente de mejorar enfoques inmunoterápicos seguros y eficaces en el tratamiento de dichas enfermedades.

40 **Sumario de la invención**

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una combinación de composiciones inmunoterápicas para su uso simultáneamente en un método para prevenir, mejorar o tratar al menos un síntoma de una enfermedad o afección en un individuo, para aumentar la supervivencia de un individuo que tiene la enfermedad o afección, y/o para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica contra uno o más antígenos en el individuo, en la que las composiciones comprenden:

- 50 a) una primera composición inmunoterápica que comprende un virus variolovacunal recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican B7-1, ICAM 1 y LFA-3 o porciones biológicamente activas de los mismos, y una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo; y
- 55 b) una segunda composición inmunoterápica que comprende un vehículo de levadura que comprende al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo,

en la que cada una de las composiciones inmunoterápicas primera y segunda comprende el mismo antígeno o dominio inmunógeno del mismo.

60 Una realización de la invención se refiere a la combinación para su uso en un método para prevenir, mejorar o tratar al menos un síntoma de un cáncer en un individuo, para aumentar la supervivencia de un individuo con cáncer y/o para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica contra uno o más antígenos de cáncer en el individuo.

65 En un aspecto de la presente invención, al menos una semana después de la primera administración, el método incluye adicionalmente la etapa de administrar al individuo: (a) una tercera composición inmunoterápica que comprende: (i) un virus de la viruela aviar recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican B7-1, ICAM-I y LFA-I o porciones biológicamente activas de los mismos, y una secuencia de ácido nucleico que

codifica el al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo; y (b) la segunda composición inmunoterápica que comprende un vehículo de levadura que comprende el al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo. Las composiciones inmunoterápicas primera y segunda se administran simultáneamente al individuo.

- 5 En una realización, la primera composición inmunoterápica comprende adicionalmente el factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). El GM-CSF puede ser proporcionado por un virus de la viruela aviar recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica GM-CSF.

Otra realización de la invención se refiere a un kit que comprende las siguientes composiciones inmunoterápicas:

- 10 a) una primera composición inmunoterápica que comprende un virus variolovacunal recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican B7-1, ICAM-1 y LFA-3 o porciones biológicamente activas de los mismos, y una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo, que comprende además opcionalmente GM-CSF; y
- 15 b) una segunda composición inmunoterápica que comprende un vehículo de levadura que comprende al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo,

en el que las composiciones inmunoterápicas primera y segunda comprenden el mismo antígeno o dominio inmunógeno del mismo. En un aspecto, el antígeno es un antígeno de cáncer. En un aspecto, el antígeno es un CEA modificado que comprende un epítipo CAP-1-6D.

En un aspecto, el kit comprende adicionalmente una tercera composición inmunoterápica que comprende: (i) un virus de la viruela aviar recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican B7-1, ICAM-I y LFA-I o porciones biológicamente activas de los mismos, y una secuencia de ácido nucleico que codifica el al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo.

En un aspecto, el virus variolovacunal es un virus variolovacunal Ankara modificada (MVA). Los inventores también describen moléculas inmunoestimuladoras que incluyen, pero no se limitan a, B7.1 (B7-1), B7.2 (B7-2), ICAM-I, LFA-3, 4-1BBL, CD59, CD40, CD40L y/o CD70. Los inventores también describen que las moléculas inmunoestimuladoras comprenden una o más citocinas, incluyendo, pero no limitadas a, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), IFN- α , IFN- λ , interleucina-12 (IL-12), RANTES e interleucina-2 (IL2). En un aspecto, la citocina es el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

En un aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), incluyendo cualquiera de las realizaciones relacionadas con una composición o kit de la invención, la segunda composición inmunoterápica comprende un vehículo de levadura que expresa al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo. En un aspecto, el vehículo de levadura en la segunda composición inmunoterápica es una levadura entera. En un aspecto, el vehículo de levadura en la segunda composición inmunoterápica es una levadura entera, inactivada por calor. En un aspecto, el vehículo de levadura en la segunda composición inmunoterápica es de *Saccharomyces*.

En un aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), las composiciones inmunoterápicas primera y segunda (y/o la tercera composición inmunoterápica en ciertas realizaciones) se administran en diferentes sitios en el individuo. En otro aspecto, las composiciones inmunoterápicas primera y segunda (y/o tercera) se administran al mismo sitio o en sitios adyacentes en el individuo.

En otro aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), el método o el uso comprende adicionalmente una etapa de reforzar el individuo con una o ambas (o las tres, en ciertas realizaciones) composiciones inmunoterápicas. En un aspecto, el individuo se refuerza con la segunda composición inmunoterápica con más frecuencia que con la primera composición inmunoterápica.

En otro aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), en el que hay una primera y segunda composición inmunoterápica, el método o uso comprende adicionalmente una etapa de reforzar al individuo con una tercera composición inmunoterápica que comprende un virus recombinante que comprende el genoma vírico o porciones del mismo que es diferente de la primera composición inmunoterápica. Por ejemplo, en un aspecto, la primera composición inmunoterápica comprende un virus variolovacunal recombinante y la tercera composición inmunoterápica comprende un virus de la viruela aviar.

En un aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento, ya sea la primera o la segunda composición inmunoterápica se administra más frecuentemente que la otra. Por ejemplo, en un aspecto, cuando la primera composición inmunoterápica es una composición inmunoterápica a base de virus y la segunda composición inmunoterápica es una composición inmunoterápica a

base de levadura, la segunda composición inmunoterápica pueden administrarse más frecuentemente que la primera composición inmunoterápica. Por ejemplo, en un aspecto, entre administraciones simultáneas de la composición inmunoterápica primera y segunda, la segunda composición inmunoterápica puede administrarse una, dos, tres o más veces adicionales.

5 En otro aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), el método comprende adicionalmente una etapa de reforzar el individuo con otra fuente del antígeno o dominio inmunógeno del mismo.

10 En otro aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), el método comprende adicionalmente una etapa de administrar al menos un modificador de la respuesta biológica al individuo.

15 En un aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), el individuo tiene cáncer. En un aspecto, el método o uso reduce la carga tumoral o inhibe el crecimiento tumoral en el individuo. En un aspecto de cualquier realización de la invención, el antígeno es de un cáncer seleccionado entre el grupo de: melanomas, carcinoma de células escamosas, cánceres de mama, carcinomas de cabeza y cuello, carcinomas de tiroides, sarcomas de tejidos blandos, sarcomas óseos, cánceres testiculares, cánceres de próstata, cánceres de ovario, cánceres de vejiga, cánceres de piel, cánceres cerebrales, angiosarcomas, hemangiosarcomas, tumores de mastocitos, leucemias, linfomas, cánceres hepáticos primarios, cánceres de pulmón, cánceres de páncreas, cánceres gastrointestinales, carcinomas de células renales, neoplasias hematopoyéticas o cánceres metastásicos de los mismos. En un aspecto, el antígeno se selecciona entre el grupo de: antígeno carcinoembrionario (CEA), oncoproteína Ras mutada puntualmente, Brachyury, MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, oncoproteínas p53 normales y mutadas puntualmente, PSMA, tirosinasa, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, coli de poliposis adenomatosa (APC), Myc, proteína de von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógenos (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, cws-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, mesotelina, NGEP, modificaciones de dichos antígenos, variantes de corte y empalme de dichos antígenos y agonistas de epítomos de dichos antígenos, así como combinaciones de dichos antígenos y/o dominios inmunógenos de los mismos, modificaciones de los mismos, variantes de los mismos y/o agonistas de epítomos de los mismos. En un aspecto, el antígeno es el antígeno carcinoembrionario (CEA), que, en una realización, comprende un epítopo CAP1-6D. En un aspecto, el antígeno es un CEA modificado que comprende un epítopo CAP-1-6D. En un aspecto, el CEA comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 1). En otro aspecto, el antígeno es Ras mutado. En un aspecto, el antígeno es una proteína de fusión de múltiples dominios, que comprende uno o más fragmentos de Ras, cada fragmento que comprende una o más mutaciones en la posición 12, 13, 59, 61 y/o 76 de Ras. En un aspecto, la proteína de fusión Ras tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 3), la SEQ ID NO: 6 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 5), la SEQ ID NO: 8 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 7) y/o la SEQ ID NO: 10 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 9). En un aspecto, el antígeno es Brachyury. En un aspecto, el antígeno es MUC-1. En un aspecto, el antígeno es EGFR. En un aspecto, el antígeno es BCR-Abl.

45 En un aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), el método o uso incluye adicionalmente una etapa de tratamiento del individuo con quimioterapia y/o de tratamiento del individuo con radioterapia.

50 En otro aspecto de cualquiera de las realizaciones o aspectos de la invención que se describe en el presente documento (anteriormente o a continuación), el individuo tiene una enfermedad provocada por o asociado a un patógeno. En un aspecto, el método o uso reduce o previene la infección del individuo por el patógeno. En un aspecto, el método o uso reduce el título patogénico en el individuo.

55 En un aspecto de cualquier realización de la invención, el antígeno se selecciona entre el grupo de: antígenos víricos, antígenos fúngicos, antígenos bacterianos, antígenos helmínticos, antígenos parasitarios, antígenos ectoparasitarios y antígenos protozoarios. En un aspecto, el antígeno es de un virus seleccionado entre: adenovirus, arena virus, bunyavirus, coronavirus, virus Coxsackie, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, flavivirus, hepadnavirus, virus de la hepatitis, virus del herpes, virus de la gripe, lentivirus, virus del sarampión, virus de las paperas, mixovirus, virus oncogénicos, ortomixovirus, virus del papiloma, papovavirus, virus paragripal, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, virus de la viruela, virus de la rabia, virus respiratorio sincitial, reovirus, rabdovirus, virus de la rubeola, togavirus, virus de la varicela y virus linfotrópicos T. En un aspecto, el antígeno es de un agente infeccioso de un género seleccionado entre el grupo que consiste en: *Aspergillus*, *Bordetella*, *Brugia*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidia*, *Cryptococcus*, *Dirofilaria*, *Escherichia*, *Francisella*, *Gonococcus*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Paramecium*, *Pertussis*, *Plasmodium*, *Pneumococcus*, *Pneumocystis*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Toxoplasma*, *Vibriocholerae* y *Yersinia*. En un aspecto, el antígeno es de una bacteria de un género seleccionado entre: *Pseudomonas*, *Bordetella*,

Mycobacterium, Vibrio, Bacillus, Salmonella, Francisella, Staphylococcus, Streptococcus, Escherichia, Enterococcus, Pasteurella y Yersinia.

Breve descripción de las figuras de la invención

- 5 Las Figuras 1A-1I son gráficos que muestran que la vacunación con rV-CEA/TRICOM o levadura-CEA induce perfiles diferenciales de citocinas séricas (Figura 1A = MIP1 α , Figura 1B = RANTES, Figura 1C = GM-CSF, Figura 1D = IL-6, Figura 1E = IL-12p70, Figura 1F = IL-13, Figura 1G = IL-1 α , Figura 1H = IL-1 β y la Figura 1I = IL-5.
- 10 Las Figuras 2A-2G muestran que se inducen distintos repertorios de TCR a partir de la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA (no se muestran perfiles V α para ningún tratamiento (Figura 2A), rV/F-CEA/TRICOM (Figura 2B) y levadura-CEA (Figura 2C) y no se muestran perfiles V β para ningún tratamiento (Figura 2D), rV/F-CEA/TRICOM (Figura 2E) y levadura-CEA (Figura 2F).
- 15 La Figura 3A muestra los epítomos individuales, no solapados, CEA-526 y CEA-572 en el bucle A3 del dominio III de CEA.
- Las Figuras 3B-3C muestran que la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA induce distintos perfiles de citocinas en respuesta a la estimulación *in vitro* con dos epítomos individuales específicos de CEA, CEA-526 (Figura 3B) y CEA-572 (Figura 3C).
- 20 Las Figuras 4A-4D muestran que las estirpes de linfocitos T específicas para el epítomo de CEA-572 de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA tienen distintos perfiles V α de TCR perfiles (repertorios de TCR V α de estirpes de linfocitos T rV/F-CEA/TRICOM (barras de color negro) mantenidos en presencia de péptido CEA-526 (Figura 4A) y péptido CEA-572 (Figura 4B); repertorios de TCR V α de estirpes de linfocitos T de levadura-CEA (barras de color blanco) mantenidos en presencia de péptido CEA-526 (Figura 4C) y péptido CEA572 (Figura 4D)).
- 25 Las Figuras 5A-5F muestran que las estirpes de linfocitos T específicas de epítomo generadas a partir de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA tienen niveles similares de actividad lítica pero una avidéz singular (las Figuras 5A y 5C muestran estirpes de linfocitos T generadas a partir de vacunación con rV/F-CEA/TRICOM y específicas para péptido CEA-526 (Figura 5A) y péptido CEA-572 (Figura 5C); las Figuras 5B y 5d muestran estirpes de linfocitos T generadas a partir de vacunación con levadura-CEA y específicas para péptido CEA-526 (Figura 5B) y péptido CEA572 (Figura 5D); las Figuras 5E y 5F muestran estirpes de linfocitos T específicas para epítomo de CEA572, generadas a partir de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM (Figura 5E) o levadura-CEA (Figura 5F)).
- 30 La Figura 6 muestra que la administración simultánea de vacunas de rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA en un modelo de metástasis pulmonar ortotópica aumenta la eficacia antitumoral.

Descripción detallada de la invención

- La presente descripción se refiere al uso simultáneo de dos composiciones inmunoterápicas (también denominadas en el presente documento vacunas) para la inducción de respuestas inmunitarias terapéuticas y/o para la prevención, mejora y/o tratamiento de una enfermedad, incluyendo, pero no limitada a, el cáncer y enfermedades infecciosas. Más específicamente, mediante el uso de vacunas inmunoterápicas de virus recombinantes y vacunas inmunoterápicas a base de levadura, cada una dirigida al mismo antígeno o dominio inmunógeno del mismo, se demuestra en el presente documento que tanto los vectores de vacuna como el antígeno tienen un papel en la inducción de poblaciones de linfocitos T que tienen respuestas de citocinas, perfiles de expresión génica y fenotipos del receptor de linfocitos T tanto compartidos como únicos. En consecuencia, tanto el antígeno como el vector desempeñan un papel en la inducción de poblaciones de linfocitos T distintas. Los estudios presentados en el presente documento indican que se inducen poblaciones de linfocitos T fenotípica y funcionalmente distintas mediante dos plataformas de vectores que se dirigen al mismo antígeno. Por último, los inventores han demostrado que las dos vacunas pueden combinarse simultáneamente para mejorar la eficacia terapéutica, demostrando que la administración simultánea de las vacunas mejoró la eficacia antitumoral en los experimentos que se describen en el presente documento. Estos resultados indican un beneficio terapéutico a partir de la administración simultánea de dos plataformas de vectores distintas dirigidas a un único antígeno, debido a la inducción de una población de linfocitos T más diversa y a una eficacia terapéutica mejorada.
- 40
- 45
- 50
- 55 Se cree que este estudio es el primero en demostrar la administración simultánea eficaz de dos vectores de vacuna diferentes dirigidos al mismo antígeno. Aunque se había demostrado previamente que cada una de las vacunas utilizadas en los estudios que se describen en el presente documento inducen individualmente niveles similares de proliferación de linfocitos T CD4+ y actividad citolítica de linfocitos T CD8+ (Wansley et al., *Clin Cancer Res*, 1 de julio de 2008; 14 (13): 4316-25), el descubrimiento de que estas vacunas inducen poblaciones de linfocitos T fenotípica y funcionalmente distintas y de que las vacunas pueden combinarse simultáneamente para mejorar sustancialmente la eficacia antitumoral, no se conocía ni se esperaba.
- 60
- A diferencia de estudios anteriores que muestran que la funcionalidad de poblaciones de linfocitos T inducidas por dos plataformas de vacunas diferentes (rV y adenovirus recombinante) dirigidas al mismo antígeno (OVA) no difirió (Millar et al., 2007, *Cell Immunol* 250 (1-2): 55-67), la presente invención proporciona pruebas de que tanto el vector como el antígeno afectan a la funcionalidad de la población de linfocitos T inducida por dos vacunas

inmunoterápicas diferentes, una, una composición inmunoterápica a base de virus (denominada en el presente documento rV-CEA/TRICOM) y, la otra, una composición inmunoterápica a base de levadura (denominada en el presente documento levadura-CEA). Comparando las poblaciones de linfocitos T inducidas por ambas vacunas en términos de producción de citocinas, expresión génica y perfiles de TCR, los estudios presentados en el presente documento descubrieron que rV-CEA/TRICOM induce una respuesta Th1 y linfocitos T CD8+ con un fenotipo Tc1, mientras que levadura-CEA induce una respuesta mixta Th1/Th2 y linfocitos T CD8+ con un fenotipo mixto Tc1/Tc2 (Figuras 1 y 3). Se observaron una regulación positiva de genes implicados en la migración de células inmunitarias y la señalización TCR y una proliferación de linfocitos T en ambas vacunas (Tabla 1). Curiosamente, aunque estas vacunas modulan la expresión de genes que participan en diversas vías celulares de una manera aparentemente desventajosa, las respuestas inmunitarias específicas de antígeno o la eficacia antitumoral no se anulan (Wansley et al., *Clin Cancer Res*, 1 de julio de 2008; 14 (13): 4316-25). También se demuestra en el presente documento que las poblaciones de linfocitos T inducidas por cualquiera de las vacunas tienen un uso de genes TCR V α y V β tanto compartido como único (Figura 2) y que las estirpes de linfocitos T creadas a partir de ratones vacunados con CEA-Tg, específicas para uno de los dos epítomos de CEA demuestran avidez diferencial y actividad citolítica específica de antígeno (Figura 5). Tomados en conjunto, estos estudios demuestran que las dos vacunas inmunoterápicas inducen poblaciones de linfocitos T distintas y diferencias en el fenotipo y la función de estas poblaciones de linfocitos T pueden atribuirse tanto al vector como al antígeno. Estos descubrimientos son aplicables al uso de cualquier antígeno en el contexto de las composiciones inmunoterápicas.

El modo de entrega de antígenos mediante cualquiera de las plataformas de vacunas puede influir en la generación de estas respuestas distintas. El mecanismo por el cual levadura-CEA activa predominantemente la respuesta inmunitaria es a través de la captación de la levadura que expresa CEA y el posterior procesamiento y presentación del antígeno CEA por las células dendríticas (CD) (Bernstein et al., *Vaccine*, 24 de enero de 2008; 26 (4): 509-21), mientras que los vectores rV/F-CEA/TRICOM infectan las células, induciendo la expresión intracelular que permite que el antígeno CEA se procese y presente (Hodge et al., *Cancer Res*, 15 de noviembre de 1999; 59 (22): 5800-7). Otra diferencia observada es que la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM induce la producción de anticuerpo específico de CEA mientras que con levadura-CEA no (datos no mostrados). Dichas diferencias de mecanismo en la activación de las vías humorales y celulares del sistema inmunitario también pueden influir sobre la inducción específica de vector y de antígeno de poblaciones de linfocitos T distintas.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que la administración de dos vacunas que se dirigen al mismo antígeno induce poblaciones de linfocitos T distintas y da como resultado una inmunidad antitumoral significativamente mayor en un modelo de metástasis pulmonar ortotópica murina (Figura 6). Este estudio también mostró por primera vez que dos plataformas de vacunas dirigidas al mismo antígeno podrían administrarse simultáneamente debido a su inducción de poblaciones de linfocitos T distintas. Además, estos datos demuestran que la administración simultánea de las dos vacunas da como resultado un aumento sustancial de los efectos antitumorales, debido a la inducción de una población de linfocitos T más diversa que se dirige al mismo antígeno. Estos descubrimientos indican que la combinación simultánea de estas vacunas puede usarse para aumentar la inmunidad específica de antígeno. El uso simultáneo de las vacunas inmunoterápicas como se describen en el presente documento induce una población de linfocitos T más diversa que consiste en linfocitos T generados a partir de ambas vacunas, haciendo innecesaria una pauta sensibilización-refuerzo diversificada utilizada antes de la invención, aunque la combinación de una pauta sensibilización-refuerzo diversificada con el protocolo de administración simultánea descrito en el presente documento puede potenciar adicionalmente una respuesta inmunitaria eficaz. La presente invención maximiza la respuesta inmunitaria que se inicia con la vacunación inicial mediante la inducción de una población de linfocitos T más diversa que después se refuerza y se amplifica en magnitud con cada vacunación posterior. Dicha estrategia sería eficaz en pacientes con cáncer, así como en pacientes que padecen una enfermedad infecciosa crónica, debido a que se induciría una población de linfocitos T más diversa al principio de su tratamiento.

En consecuencia, la presente invención se refiere al uso simultáneo de dos o más composiciones inmunoterápicas diferentes para inducir respuestas inmunitarias terapéuticas contra uno o más antígenos y/o para prevenir, mejorar y/o tratar una enfermedad o afección, incluyendo el cáncer o una enfermedad infecciosa. Las dos o más composiciones inmunoterápicas diferentes se dirigen al mismo antígeno o antígenos. En una realización, las dos o más composiciones inmunoterápicas se administran simultáneamente, pero en diferentes sitios físicos en el paciente. En otra realización, las dos o más composiciones inmunoterápicas diferentes se administran simultáneamente y en el mismo sitio, o en uno sustancialmente adyacente, en el paciente.

Los dos o más composiciones inmunoterápicas diferentes utilizadas en la presente invención son capaces, cada una de forma individual, de inducir una respuesta inmunitaria y preferentemente, al menos una respuesta inmunitaria celular y, más preferentemente, una respuesta inmunitaria celular mediada por linfocitos T. En un aspecto, al menos una de las composiciones es capaz de inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+ y/o CD4+ y más preferentemente, una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4+ y una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+. Preferentemente, todas las composiciones utilizadas simultáneamente de acuerdo con la invención son capaces de inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+ y/o una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4+ y, más preferentemente, una respuesta inmunitaria CD8+ y una respuesta inmunitaria CD4+. Opcionalmente, al menos una de las composiciones es capaz de inducir una respuesta

inmunitaria humoral. Preferentemente, la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T que se induce por una de las composiciones inmunoterápicas es fenotípicamente y/o funcionalmente distinta en uno o más aspectos de la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T que se induce por la otra composición inmunoterápica. En un aspecto, la composición inmunoterápica tiene una o más de las siguientes características: (a) estimula uno o más receptores de reconocimiento de patrones eficaces para activar una célula presentadora de antígeno; (b) regula positivamente moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras y moléculas del CMH de clase I y/o de clase II sobre células presentadoras de antígeno; (c) induce la producción de citocinas proinflamatorias por células presentadoras de antígeno; (d) induce la producción de citocinas de tipo Th1 por los linfocitos T; (e) induce la producción de citocinas de tipo Th17 por los linfocitos T; (f) inhibe o regula negativamente Treg; y/o (g) induce respuestas inmunitarias específicas de antígeno de CMH de clase I y/o CMH de clase II. Las composiciones inmunoterápicas adecuadas pueden incluir composiciones inmunoterápicas a base de levadura, composiciones inmunoterápicas a base de virus, composiciones inmunoterápicas a base de anticuerpo, composiciones inmunoterápicas de ADN, vacunas de subunidades y cualesquier componentes o adyuvantes útiles para estimular o modular una respuesta inmunitaria, tales como agonistas de TLR, citocinas, potenciadores inmunitarios y otros agentes, y cualquier combinación de los mismos, muchos de los cuales se describen en más detalle a continuación. En un aspecto, las composiciones inmunoterápicas que se han de usar en la presente invención incluyen composiciones a base de virus y composiciones a base de levadura recombinantes (que se describen en detalle a continuación).

Composición inmunoterápica a base de virus

Un aspecto de la invención se refiere a una composición inmunoterápica a base de virus recombinante (frase que puede usarse de forma intercambiable con "producto inmunoterápico a base de virus", "composición a base de virus", "inmunoterápico basado en virus", "vacuna a base de virus", "composición inmunoterápica que comprende o incluye un virus recombinante o vector vírico recombinante" o cualquier derivación similar de estas frases). Como se usa en el presente documento, la frase "composición inmunoterápica a base de virus" se refiere a una composición que incluye un componente de vector vírico (por ejemplo, un virus recombinante o porción del mismo eficaz para constituir un vector vírico) y que induce una respuesta inmunitaria suficiente para conseguir al menos un beneficio terapéutico en un sujeto. Se describen en detalle composiciones inmunoterápicas a base de virus y métodos de fabricación y, en general, el uso de las mismas, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 6.045.802, la Patente de los EE.UU. N.º 6.893.869, la Patente de los EE.UU. N.º 6.548.068 y la Patente de los EE.UU. N.º 6.969.609. En un aspecto, una composición inmunoterápica a base de virus útil en la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+ y/o una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4+ y, en un aspecto, una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+ y una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4+ y, en un aspecto, una respuesta inmunitaria humoral. Una composición inmunoterápica a base de virus útil en la presente invención puede, por ejemplo, inducir una respuesta inmunitaria en un individuo de manera que se trate el individuo para la enfermedad o afección, o de manera que se alivien o se traten los síntomas resultantes de la enfermedad o afección.

Una composición inmunoterápica a base de virus normalmente comprende un vector vírico que comprende un genoma vírico o porciones del mismo (por ejemplo, un virus recombinante) y una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno o antígenos a partir de un agente que provoca una enfermedad o patología (por ejemplo, antígeno o antígenos de cáncer, antígeno de una enfermedad infecciosa o enfermedades infecciosas y/o al menos un dominio inmunógeno de los mismos). En algunas realizaciones, una composición inmunoterápica a base de virus incluye, además, al menos un vector vírico que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican una o más molécula o moléculas inmunoestimuladoras. En algunas realizaciones, los genes que codifican moléculas inmunoestimuladoras y antígenos se insertan en el mismo vector vírico (el mismo virus recombinante).

Los virus que pueden usarse en dichas composiciones inmunoterápicas de la presente invención son cualquier tipo de virus que infecte células, induciendo la expresión intracelular del antígeno transportado por el virus que permite que el antígeno se procese y se presente. Entre estos virus se prefieren aquellos que inducen una respuesta Th1 y linfocitos T CD8+ con un fenotipo Tc1. Los virus que pueden usarse en una composición de la invención incluyen los virus en los que una porción del genoma puede eliminarse para introducir nuevos genes sin destruir la infectividad del virus.

Los virus parentales (es decir, virus a partir de los cuales se producen, derivan, basan, etc. vectores víricos/virus recombinantes) útiles en la producción de vectores víricos de la invención incluyen, pero no se limitan a, virus de la viruela, virus del herpes, adenovirus, alfavirus, retrovirus, picornavirus, baculovirus e iridovirus. Los virus de la viruela (miembros de la familia *Poxviridae*) que tiene utilidad en la presente invención incluyen vectores replicantes y no replicantes. Dichos virus de la viruela incluyen, pero no se limitan a, orthopox (género *Orthopoxvirus*), tales como virus variolovacunal (Perkus et al., *Science* 229: 981-984, 1985; Kaufman et al., *Int J. Cancer* 48: 900-907, 1991; Moss, *Science* 252: 1662, 1991), viruela del mapache, viruela de conejo y similares, viruela aviar (género *Avipoxvirus*) incluyendo virus de la viruela aviar, viruela porcina (género *Suiipoxvirus*), viruela caprina (género *Capripoxvirus*) y similares. Los virus de la viruela pueden seleccionarse entre el grupo del virus variolovacunal-Copenhague, virus variolovacunal-cepa Wyeth, virus variolovacunal altamente atenuado (virus variolovacunal-cepa MVA), virus variolovacunal Ankara modificado (Sutter y Moss, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89: 10847- 10851; Sutter et al., *Virology* 1994), NYVAC, TROVAC, viruela del canario, ALVAC (Baxby y Paoletti, *Vaccine* 10: 8-9, 1992; Rinns,

M. M. et al., (Editores) *Recombinant Poxviruses* CRC Press, Inc., Boca Ratón 1992; Paoletti, E., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 93: 11349-11353, 1996), viruela porcina y similares. Un derivado del virus variolovacunal-cepa Wyeth incluye, pero no se limita a, vTBC33 que carece de un gen K1L funcional. En otra realización más, el virus es Dry-Vax disponible como una vacuna contra la viruela de los Centros para el Control de Enfermedades de los EE.UU., Atlanta, Georgia. En una realización, el vector recombinante es un virus variolovacunal. En otra realización, el vector recombinante es del virus de la viruela aviar. Una cepa de virus de la viruela aviar, por ejemplo, es POXVAC-TC (Schering-Plough Corporation).

Los virus de la viruela recombinante que tiene utilidad en la presente invención tienen una serie de atributos, incluyendo (i) entrega eficaz de genes a múltiples tipos celulares, incluyendo células presentadoras de antígeno (CPA) y células tumorales; (ii) altos niveles de expresión de proteína; (iii) presentación óptima de antígenos al sistema inmunitario; (iv) capacidad de provocar respuestas inmunitarias mediadas por células así como respuestas de anticuerpos; (v) modificación genética transitoria, en lugar de permanente, de las células y (vi) la capacidad de usar combinaciones de virus de la viruela de diferentes géneros, ya que, inmunológicamente, no tienen reacción cruzada.

Los virus variolovacunal recombinante (rV, rMVA) y de la viruela aviar recombinante (rF) son dos virus de ejemplo para su uso en las composiciones inmunoterápicas a base de virus de la invención. Se han descrito virus variolovacunal y de la viruela aviar recombinantes que contienen genes murinos B7-1, ICAM-1 y LFA-3, así como el gen de CEA humano (rV/F-CEA/TRICOM) (Hodge et al., *Cancer Res*, 15 de noviembre de 1999; 59 (22): 5800-7; Grosenbach et al., *Cancer Res*, 1 de junio de 2001; 61 (11): 4497-505; y Hodge et al., *Cancer Res*, 15 de noviembre de 2003; 63: 7942-7949). El virus rF que expresa GM-CSF murino (rF-GM-CSF) se ha descrito anteriormente (Kass et al., *Cancer Res*, 1 de enero de 2001; 61 (1): 206-14). Para los fines de la presente invención, una vacuna designada "rV/F-CEA/TRICOM" se refiere a un protocolo de vacuna completo que incluye una sensibilización con rV-CEA/TRICOM (polinucleótidos que contienen virus variolovacunal recombinante que codifica B7-1, ICAM-1, LFA-3 y CEA) mezclada con rF-GM-CSF (virus de la viruela aviar recombinante que contiene un gen que codifica GM-CSF), que se refuerza cada 7 días con virus de la viruela aviar recombinante rF-CEA/TRICOM que contiene polinucleótidos que codifican B7-1, ICAM-1, LFA-3 y CEA) mezclado con rF-GM-CSF. Ha de entenderse que CEA es solo un ejemplo de un antígeno adecuado (en el presente documento, un antígeno asociado a tumor o de cáncer) para usarse junto con una o más composiciones inmunoterápicas de la invención.

El vector vírico de la presente invención comprende al menos un elemento de control de la expresión unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico. Los elementos de control de la expresión se insertan en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico (Ausubel et al., 1987, en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York, NY). Los elementos de control de la expresión son conocidos en la técnica e incluyen los promotores. Son promotores útiles en la presente invención los promotores de virus de la viruela como se conocen en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, 30K, 13, sE/L, 7.5K, 40 K y C1. La secuencia de ácido nucleico del promotor 30K se desvela en n.º de acceso de GenBank M35027 en los números de base 28.012 a 28.423 (antisentido). La secuencia de ácido nucleico de 13, se desvela en (n.º de acceso de GenBank J03399 en los números de base 1100 a 1301 (antisentido). La secuencia de ácido nucleico del promotor 7.5K se desvela en (n.º de acceso de GenBank M35027 en los números de base 186550 a 186680. La secuencia de ácido nucleico del promotor 40K se desvela en (n.º de acceso de GenBank M13209 en los números de base 9700 a 9858 (antisentido). La secuencia de ácido nucleico del promotor C1 se desvela en (n.º de acceso de GenBank M59027 en los números de base 1 a 242 y en la Patente de los EE.UU. N.º 5.093.258. La secuencia del promotor sE/L se conoce en la técnica. Pueden usarse otros promotores de virus de la viruela, tales como, los descritos por Davison y Moss (*J. Mol Biol* 210: 749-769 (1989)). Cualquiera de estos promotores puede sintetizarse mediante el uso de métodos convencionales en la técnica. La selección de un promotor apropiado se basa en su sincronización y nivel de expresión. En un aspecto se usan promotores tempranos o tempranos/tardíos. En una realización, el promotor o combinación de promotores utilizados permiten la expresión óptima de cada molécula de antígeno y/o coestimuladora en un hospedador infectado para proporcionar una respuesta inmunitaria sinérgica. En una realización, cada molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de antígeno o coestimuladora es controlada por un promotor separado y distinto.

Como se usa en el presente documento con cualquier composición inmunoterápica que se describe para su uso en la invención presente, las moléculas inmunoestimuladora incluyen, pero no se limitan a, citocinas y moléculas coestimuladoras. Por ejemplo, las citocinas pueden incluir, pero no se limitan a, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), IFN- α , IFN- λ , interleucina-12 (IL-12), RANTES e interleucina-2 (IL2). Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, B7.1 (también denominada en el presente documento B7-1), B7.2 (también denominada en el presente documento B7-2), ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL, CD59, CD40, CD40 y CD70. Las moléculas inmunoestimuladoras pueden proporcionarse en una composición inmunoterápica solas y/o en una diversidad de combinaciones de la invención y pueden ser expresadas por uno o más vectores víricos u otros vectores de vacuna. En un aspecto, el vector recombinante de la presente invención comprende genes que codifican al menos tres moléculas coestimuladoras para la potenciación sinérgica de la respuesta inmunitaria que no puede obtenerse mediante el uso de una molécula coestimuladora individual o una doble. Los genes que codifican diversas combinaciones de moléculas coestimuladoras son un elemento de la invención para su uso en el vector recombinante y pueden incluir

combinaciones tales como: B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA-3; B7.1, ICAM-1 y LFA-3; B7.1, B7.2, ICAM-1 y 4-1BBL; B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3 y 4-1BBL; CD59 y VCAM-1; y B7.1 y B7.2; CD59, CD40, 4-BBL CD70 y VCAM-1, B7.1, B7.2; OX-40L, 4-1BBL; dependiendo de la respuesta inmunitaria deseada y la enfermedad o afección que se ha de tratar.

5 B7.1 (CD80) es un ligando natural para el antígeno de linfocitos T, CD28, que media la adhesión de los linfocitos T y las células B. B7.1 se expresa en células B activadas y monocitos estimulados con interferón gamma. La unión de CD80 a CD28 y CTLA-4 proporciona una señal coestimuladora a los linfocitos T y conduce a la producción de linfocinas regulada positivamente. B7.2 (CD86) es un ligando alternativo para CD28 y CTLA-4.

10 ICAM-1 (Molécula de Adhesión Intercelular 1), también conocida como CD54, es una molécula de adhesión intercelular asociado a leucocitos y al endotelio y es un ligando para LFA-1 (integrina), un receptor de leucocitos. ICAM-1 se regula positivamente tras la estimulación por citocinas y está implicado en interacciones celulares, en la trans migración endotelial de leucocitos y en la señalización relacionada con el reclutamiento de células inmunitarias proinflamatorias.

15 LFA-3 (antígeno 3 asociado a la función de los linfocitos) o CD58, es una molécula de adhesión expresada por las células presentadoras de antígeno (CPA), que median en una señal coestimuladora a través de CD2, una molécula de adhesión que se encuentra en los linfocitos T y los linfocitos citolíticos naturales (NK). Esta interacción promueve la adhesión intercelular y la activación de linfocitos T.

20 4-1BBL se expresa en células presentadoras de antígeno activadas (CPA) y es el ligando para 4-1BB, un miembro coestimulador de la familia de receptores de factores de necrosis tumoral expresado en linfocitos T CD4 y CD8 activados. La interacción de estas moléculas puede potenciar la proliferación y supervivencia de los linfocitos T y amplificar y activar la memoria de linfocitos T CD8+ (Bukczynski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101 (5): 1291-6).

30 CD59 es una proteína reguladora del complemento. Los virus, incluyendo el virus variolovacunal, incorporan CD59 de la célula hospedadora en su propia envoltura vírica para evitar la lisis por el complemento (Bohana-Kashtan et al., 2004, *Mol. Immunol.* 41 (6-7): 583-97).

VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular 1), o CD106, es una molécula de adhesión expresada por las células endoteliales y media la adhesión de los linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos al endotelio vascular. También actúa en la transducción de señales de leucocitos-célula endotelial.

35 CD40 es una proteína coestimuladora expresada por las células presentadoras de antígeno (CPA). La unión de CD40 a su ligando natural, CD40L, en los linfocitos T, activa la CPA e inicia una cascada de señalización que media una diversidad de respuestas inmunitarias e inflamatorias.

40 CD70 es un ligando para CD27, que es un receptor necesario para la generación y el mantenimiento de la inmunidad de linfocitos T a largo plazo.

45 OX40-L se expresa sobre la superficie de células B activadas, linfocitos T, células dendríticas y células endoteliales y se une a su receptor natural, OX40, que es expresado principalmente por linfocitos T CD4+ activados, y por tanto, esta interacción se relaciona con la activación de linfocitos T.

50 GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) es una citocina que actúa como un factor de crecimiento de leucocitos producido por linfocitos T, macrófagos y otras células. GM-CSF estimula a las células madre para que produzcan granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos, y es, por tanto, parte del proceso de activación y desarrollo del sistema inmunitario.

55 La producción simultánea de una molécula inmunoestimuladora y el antígeno o antígenos en el sitio de replicación/infección del virus (en cualquier caso, el sitio de producción de antígenos) potencia la generación de efectores específicos. Dependiendo de las moléculas inmunoestimuladoras específicos, diferentes mecanismos pueden ser responsables de la inmunogenia potenciada: el aumento de la señal de ayuda (IL-2), el reclutamiento de CPA profesional (GM-CSF), el aumento en la frecuencia de CTL (IL-2) y/o el efecto sobre la vía de procesamiento del antígeno y la expresión de CMH (IFN- γ y TNF α). En algunos casos, puede ser beneficioso producir un virus recombinante que comprenda más de un antígeno de interés con el fin de tener una vacuna multivalente.

60 En una realización, una composición farmacéutica comprende un virus recombinante (por ejemplo, un virus de la viruela) que contiene moléculas de ácido nucleico que codifican múltiples moléculas coestimuladoras en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El virus recombinante puede comprender adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo o, como alternativa, puede proporcionarse un segundo virus recombinante (por ejemplo, un virus de la viruela) que codifique al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo.

65

En una realización, una composición inmunoterápica a base de virus útil en la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende un virus recombinante (por ejemplo, un virus de la viruela recombinante) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica B7.1 o B7.2, una secuencia de ácido nucleico que codifica ICAM-1 y una secuencia de ácido nucleico que codifica LFA-3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Además de la construcción de B7, ICAM-1, LFA-3, el virus recombinante de la composición farmacéutica puede comprender adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo o como alternativa, la secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo pueden proporcionarse en la composición por un segundo virus recombinante.

10 En una realización, la composición puede comprender también moléculas inmunoestimuladoras añadidas exógenamente como se conocen en la técnica incluyendo, pero no limitadas a, las moléculas coestimuladoras B7, ICAM-1, LFA-3, 4-1BBL, CD59, CD40, CD70, VCAM-1, OX-40L y/o anticuerpos que se unen a dichas moléculas inmunoestimuladoras, y/o agonistas o antagonistas de dichas moléculas inmunoestimuladoras, y/o citocinas y quimiocinas, incluyendo pero no limitadas a IL-2, GM-CSF, TNF α , IFN- γ , IFN- α , IFN- λ , IL-12, RANTES, MIP-1 α , Flt-3L (Patentes de los EE.UU. N.º 5.554.512; 5.843.423) y similares, para la sinergia o potenciación adicional de una respuesta inmunitaria. Las propias citocinas y quimiocinas pueden proporcionarse en la composición o, como alternativa, las citocinas y quimiocinas puede ser proporcionadas por un vector vírico recombinante que codifique la citocina o quimiocina.

20 En una realización de la presente invención, se proporciona un virus de la viruela recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica LFA-3 o una porción funcional del mismo bajo el control de un promotor de virus de la viruela 30K, una secuencia de ácido nucleico que codifica ICAM-1 o una porción del mismo bajo el control de un promotor de virus de la viruela I3 y una secuencia de ácido nucleico que codifica B7.1 o una porción del mismo bajo el control de un promotor de virus de la viruela sE/L. El virus de la viruela recombinante puede proporcionar adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifique al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo.

30 En otra realización de la presente invención, se proporciona un virus de la viruela recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica B7.1 bajo el control de un promotor de virus de la viruela sE/L, una secuencia de ácido nucleico que codifica LFA-3 o una porción del mismo bajo el control del promotor de virus de la viruela I3 y una secuencia de ácido nucleico que codifica ICAM-1 o una porción del mismo bajo el control del promotor de virus de la viruela 7.5K. Opcionalmente, la construcción comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos antígeno o dominio inmunógeno del mismo.

35 En una realización de la invención, un virus de la viruela aviar recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica B7.1 o una porción del mismo bajo el control del promotor de virus de la viruela sE/L, una secuencia de ácido nucleico que codifica LFA-3 o una porción del mismo bajo el control del promotor de virus de la viruela I3 y una secuencia de ácido nucleico que codifica ICAM-1 o una porción del mismo bajo el control del promotor de virus de la viruela 7.5K. Un virus de la viruela aviar recombinante puede comprender adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifique un antígeno diana bajo el control de un promotor de virus de la viruela tal como el promotor de virus de la viruela 40K.

45 La presente invención proporciona adicionalmente métodos de generación de virus recombinantes que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican antígenos y/o múltiples moléculas coestimuladoras. Un método de generación de virus de la viruela recombinantes se realiza mediante *recombinación in vivo* homóloga entre ADN genómico de virus de la viruela parental y un vector plasmídico que lleva las secuencias heterólogas que se han de insertar, como se desvela en la Patente de los EE.UU. N.º 5.093.258. Los vectores plasmídicos para la inserción de secuencias extrañas en virus de la viruela se construyen mediante métodos convencionales de tecnología de ADN recombinante. Los vectores plasmídicos contienen uno o más genes extraños quiméricos, comprendiendo cada uno un promotor de virus de la viruela unido a una secuencia codificante de proteína, flanqueados por secuencias víricas de una región no esencial del genoma del virus de la viruela. El plásmido se transfecta en células infectadas con el virus de la viruela parental usando métodos de transfección aceptados en la técnica y la recombinación entre secuencias de virus de la viruela en el plásmido y el ADN correspondiente en el genoma vírico parental da como resultado la inserción en el genoma vírico de los genes extraños quiméricos desde el plásmido. Los virus recombinantes se seleccionan y se purifican usando cualquiera de una diversidad de sistemas selección o cribado que son conocidos en la técnica. La inserción de los genes extraños en el genoma del virus variolovacuinal se confirma mediante análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La expresión de los genes extraños se demuestra mediante análisis por transferencia Western. Un método alternativo de generación de virus de la viruela recombinante se consigue mediante ligación directa (Pleiderer et al., *J. Gen. Virol.* 76: 2957-2962, 1995; Merchlinsky et al., *Virol.* 238: 444-451, 1997).

Composiciones inmunoterápicas a base de levadura

65 En una realización de la invención, la invención incluye el uso de al menos una "composición inmunoterápica a base de levadura" (frase que puede usarse de forma intercambiable con "producto inmunoterápico a base de levadura", "composición a base de levadura", "inmunoterápico a base de levadura", "vacuna a base de levadura", "composición

inmunoterápica que comprende un vehículo de levadura" o cualquier derivación similar de estas frases). Como se usa en el presente documento, la expresión "composición inmunoterápica a base de levadura" se refiere a una composición que incluye un componente de vehículo de levadura y que provoca una respuesta inmunitaria suficiente para conseguir al menos un beneficio terapéutico en un sujeto. Más en particular, una composición inmunoterápica a base de levadura es una composición que incluye un componente de vehículo de levadura y que puede provocar o inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria celular, incluyendo sin limitación una respuesta inmunitaria celular mediada por linfocitos T. En un aspecto, una composición inmunoterápica a base de levadura útil en la invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+ y/o una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4+ y, en un aspecto, una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8+ y una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4+. Opcionalmente, una composición inmunoterápica a base de levadura es capaz de provocar una respuesta inmunitaria humoral. Una composición inmunoterápica a base de levadura útil en la presente invención puede, por ejemplo, inducir una respuesta inmunitaria en un individuo de manera que se trate el individuo para la enfermedad o afección, o de manera que se alivien o se traten los síntomas resultantes de la enfermedad o afección.

Normalmente, una composición inmunoterápica a base de levadura incluye un vehículo de levadura y al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo expresado por, unido a, o mezclado con el vehículo de levadura. En algunas realizaciones, el antígeno o dominio inmunógeno del mismo se proporciona en forma de una proteína de fusión. En un aspecto de la invención, la proteína de fusión puede incluir dos o más antígenos. En un aspecto, la proteína de fusión puede incluir dos o más dominios inmunógenos de uno o más antígenos o dos o más epítomos de uno o más antígenos. Un TARMOGEN® es un ejemplo no limitante, de una composición inmunoterápica a base de levadura que es útil en la presente invención. Un TARMOGEN® (inmunógeno molecular dirigido (del inglés *TARgeted MOlecular immunoGEN*), Globelmmune, Inc., Louisville, Colorado) generalmente se refiere a un vehículo de levadura que expresa uno o más antígenos heterólogos extracelularmente (en su superficie), intracelularmente (internamente o citosólicamente) o tanto extracelularmente como intracelularmente.

Se describen en detalle composiciones inmunoterápicas a base de levadura y métodos de fabricación y, en general, de uso de las mismas, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.830.463, la Patente de los EE.UU. N.º 7.083.787, la Patente de los EE.UU. N.º 7.465.454, la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2007-0224208, la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º US 2008-0003239 y en Stubbs et al., *Nat. Med.* 7: 625-629 (2001), Lu et al., *Cancer Research* 64: 5084-5088 (2004) y en Bernstein et al., *Vaccine*, 24 de enero de 2008; 26 (4): 509-21. Se ha demostrado que estos productos inmunoterápicos a base de levadura inducen respuestas inmunitarias, incluyendo respuestas inmunitarias celulares y humorales. Los productos inmunoterápicos a base de levadura son capaces de destruir las células diana que expresan una diversidad de antígenos *in vivo*, en una diversidad de especies animales y lo hacen a través de las respuestas inmunitarias mediadas por CD8+ y/o CD4+ específicas de antígeno. Estudios adicionales han demostrado que las levaduras son fagocitadas ávidamente por las células dendríticas y las activan directamente, que después presentan proteínas asociadas a levadura a linfocitos T CD4+ y CD8+ de una manera altamente eficiente. Véase, por ejemplo, Stubbs et al. *Nature Med.* 5: 625-629 (2001) y la Patente de los EE.UU. N.º 7.083.787.

En cualquiera de las composiciones inmunoterápicas a base de levadura utilizadas en la presente invención, los siguientes aspectos relacionados con el vehículo de levadura se incluyen en la invención. De acuerdo con la presente invención, un vehículo de levadura es cualquier célula de levadura (por ejemplo, una célula entera o intacta) o un derivado de la misma (véase a continuación) que pueda usarse junto con uno o más antígenos, dominios inmunógenos de los mismos o epítomos de los mismos en una composición terapéutica de la invención o, en un aspecto, el vehículo de levadura puede usarse solo o como un adyuvante. El vehículo de levadura puede, por tanto, incluir, pero no limitarse a, un microorganismo de levadura intacto vivo (es decir, una célula de levadura que tiene todos sus componentes incluyendo una pared celular), un microorganismo destruido (muerto) o inactivado de levadura intacto o derivados del mismo, incluyendo: un esferoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de una pared celular), un citoplasto de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de pared celular y núcleo), una envuelta de levadura (es decir, una célula de levadura que carece de pared celular, núcleo y citoplasma), un extracto de membrana de levadura subcelular o fracción de la misma (también denominada una partícula de membrana de levadura y anteriormente partículas de levadura subcelulares), cualquier otra partícula de levadura o una preparación de pared celular de levadura.

Los esferoplastos de levadura normalmente se producen por digestión enzimática de la pared celular de la levadura. Se describe un método de este tipo, por ejemplo, en Franzusoff et al., 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674.

Los citoplastos de levadura normalmente se producen por enucleación de células de levadura. Se describe un método de este tipo, por ejemplo, en Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55.

Las envueltas de levadura normalmente se producen volviendo a sellar una célula permeabilizada o lisada y pueden contener, pero no necesariamente, al menos algunos de los orgánulos de esa célula. Se describe un método de este tipo, por ejemplo, en Franzusoff et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614 y Bussey et al., 1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553, 185-196.

Una partícula de membrana de levadura (extracto de membrana de levadura subcelular o fracción de la misma) se refiere a una membrana de levadura que carece de un núcleo o citoplasma natural. La partícula puede ser de cualquier tamaño, incluyendo tamaños que varían desde el tamaño de una membrana de levadura natural a micropartículas producidas por tratamiento con ultrasonidos u otros métodos de alteración de la membrana conocidos por los expertos en la materia, seguidos de cambio de escala. Se describe un método de producción de extractos de membranas de levadura subcelulares, por ejemplo, en Franzusoff et al., 1991, *Meth. Enzymol.* 194. 662-674. También pueden usarse fracciones de partículas de membrana de levadura que contengan porciones de membrana de levadura y, cuando el antígeno u otra proteína se exprese de forma recombinante por la levadura antes de la preparación de las partículas de membrana de levadura, el antígeno u otra proteína de interés. Los antígenos u otras proteínas de interés pueden llevarse dentro de la membrana, en cualquiera de las superficies de la membrana o combinaciones de los mismos (es decir, la proteína puede estar tanto dentro como fuera de la membrana y/o abarcando la membrana de la partícula de membrana de levadura). En una realización, una partícula de membrana de levadura es una partícula de membrana de levadura recombinante que puede ser una membrana de levadura intacta, alterada, o alterada y resellada que incluya al menos un antígeno deseado u otra proteína de interés en la superficie de la membrana o al menos parcialmente incrustada en la membrana.

Un ejemplo de una preparación de pared celular de levadura es paredes celulares de levadura aisladas que llevan un antígeno en su superficie o al menos parcialmente incrustado en la pared celular de manera que la preparación de pared celular de levadura, cuando se administra a un animal, estimula una respuesta inmunitaria deseada contra una enfermedad diana.

Puede usarse cualquier cepa de levadura para producir un vehículo de levadura de la presente invención. Las levaduras son microorganismos unicelulares que pertenecen a una de tres clases: Ascomycetes, Basidiomycetes y hongos imperfectos. Una consideración para la selección de un tipo de levadura para su uso como un modulador inmunológico es la patogenia de la levadura. En una realización, la levadura es una cepa no patógena tal como *Saccharomyces cerevisiae*. La selección de una cepa de levadura no patógena minimiza cualquier efecto adverso para el individuo al que se le administra el vehículo de levadura. Sin embargo, puede usarse una levadura patógena si la patogenia de la levadura puede invalidarse mediante cualquier medio conocido para un experto en la materia (por ejemplo, cepas mutantes). De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se utilizan cepas de levadura no patógenas.

Los géneros de cepas de levadura que puede usarse en la invención incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces*, *Candida* (que puede ser patógena), *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* y *Yarrowia*. En un aspecto, los géneros de levadura se seleccionan entre *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* o *Schizosaccharomyces* y, en un aspecto, se usa *Saccharomyces*. Las especies de cepas de levadura que pueden usarse en la invención incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Ha de apreciarse que varias de estas especies incluyen una diversidad de subespecies, tipos, subtipos, etc., que se pretende que se incluyan dentro de las especies mencionadas anteriormente. En un aspecto, las especies de levadura utilizadas en la invención incluyen *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* y *S. pombe*. *S. cerevisiae* es útil debido a que es relativamente fácil de manipular y es "generalmente reconocida como segura" o "GRAS" para su uso como aditivo alimentario (GRAS, Regla propuesta por la FDA 62FR18938, 17 de abril de 1997). Una realización de la presente invención es una cepa de levadura que es capaz de replicar plásmidos en un número particularmente elevado de copias, tal como una cepa cir de *S. cerevisiae*. La cepa de *S. cerevisiae* es una cepa de manera que sea capaz de soportar vectores de expresión que permitan uno o más antígenos diana y/o proteína o proteínas de fusión de antígenos y/u otras proteínas que se han de expresar en niveles altos. Además, puede usarse cualquier cepa de levadura mutante en la presente invención, incluyendo aquellas que presentan modificaciones postraduccionales reducidas de antígenos diana expresados u otras proteínas, tales como mutaciones en las enzimas que se amplifican la glucosilación ligada a N.

En una realización, un vehículo de levadura de la presente invención es capaz de fusionarse con el tipo celular al que se está entregando el vehículo de levadura y antígeno/agente, tal como una célula dendrítica o macrófago, efectuando de este modo una entrega particularmente eficiente del vehículo de levadura y, en muchas realizaciones, el antígeno o antígenos u otro agente, al tipo celular. Como se usa en el presente documento, la fusión de un vehículo de levadura con un tipo celular diana se refiere a la capacidad de la membrana de la célula de levadura, o partícula de la misma, para fusionarse con la membrana del tipo celular diana (por ejemplo, células dendríticas o macrófagos), conduciendo a la formación de sincitios. Como se usa en el presente documento, un sincitio es una masa multinucleada de protoplasma producida por la fusión de células. Se ha demostrado que una serie de proteínas víricas de superficie (incluyendo las de virus de inmunodeficiencia tales como VIH, virus de la gripe, poliovirus y adenovirus) y otros fusógenos (tales como los implicados en fusiones entre óvulos y esperma) son capaces de efectuar la fusión entre dos membranas (es decir, entre membranas celulares víricas y de mamíferos o entre membranas celulares de mamíferos). Por ejemplo, un vehículo de levadura que produce un antígeno heterólogo gp120/gp41 del VIH en su superficie es capaz de fusionarse con un linfocito T CD4+. Se destaca, sin embargo, que la incorporación de un resto de dirección en el vehículo de levadura, aunque puede ser deseable en

algunas circunstancias, no es necesaria. En el caso de vehículos de levadura que expresan antígenos extracelularmente, esto puede ser una ventaja adicional de los vehículos de levadura de la presente invención. En general, los vehículos de levadura útiles en la presente invención se captan fácilmente por las células dendríticas (así como otras células, tales como los macrófagos).

5 En algunas realizaciones de la invención, la composición inmunoterápica a base de levadura incluye al menos un antígeno, un dominio inmunógeno del mismo o epítipo del mismo. Los antígenos que se contemplan para su uso en la presente invención incluyen cualquier antígeno contra el que se desea producir una respuesta inmunitaria (se describe en más detalle a continuación).

10 De acuerdo con la presente invención, la expresión "complejo vehículo de levadura-antígeno" o "complejo levadura-antígeno" se usa generalmente para describir cualquier asociación de un vehículo de levadura con un antígeno y puede usarse de forma intercambiable con "composición inmunoterápica a base de levadura" cuando dicha composición se usa para provocar una respuesta inmunitaria como se ha descrito anteriormente. Dicha asociación incluye la expresión del antígeno por la levadura (una levadura recombinante), la introducción de un antígeno en una levadura, la unión física del antígeno a la levadura y la mezcla de la levadura y el antígeno juntos, por ejemplo, en un tampón u otra solución o formulación. Estos tipos de complejos se describen en detalle a continuación.

20 En una realización, una célula de levadura (por ejemplo, una levadura entera) utilizada para preparar el vehículo de levadura o que es el vehículo de levadura se transfecta con una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína (por ejemplo, el antígeno o agente) de manera que la proteína sea expresada por la célula de levadura. Dicha levadura también se denomina, en el presente documento, una levadura recombinante o un vehículo de levadura recombinante. La célula de levadura después puede administrarse o la célula de levadura puede inactivarse o puede derivatizarse tal como mediante formación de esferoplastos, citoplastos, envueltas o partículas subcelulares de levadura. Los esferoplastos de levadura también pueden transfectarse directamente con una molécula de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, el esferoplasto se produce a partir de una levadura entera y después se transfecta) con el fin de producir un esferoplasto recombinante que exprese un antígeno u otra proteína.

30 En un aspecto, una célula de levadura o un esferoplasto de levadura utilizados para preparar el vehículo de levadura se transfectan con una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica el antígeno o antígenos u otra proteína de manera que el antígeno u otra proteína se expresa de forma recombinante por la célula de levadura o el esferoplasto de levadura. En este aspecto, la célula de levadura o el esferoplasto de levadura que expresan de manera recombinante el antígeno o antígenos u otra proteína se usan para producir un vehículo de levadura que comprende un citoplasto de levadura, una envuelta de levadura o una partícula de membrana de levadura o una partícula de pared celular de levadura o fracción de los mismos.

35 Un número de antígenos y/u otras proteínas que han de ser producidos por un vehículo de levadura de la presente invención es cualquier número de antígenos y/u otras proteínas que puedan producirse razonablemente por un vehículo de levadura y varía normalmente de al menos una o al menos aproximadamente 6 o más, incluyendo de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 antígenos heterólogos y/u otras proteínas.

45 La expresión de un antígeno u otra proteína en un vehículo de levadura de la presente invención puede realizarse usando técnicas conocidas para los expertos en la materia. Brevemente, en un aspecto, una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno deseado u otra proteína se inserta en un vector de expresión de manera que la molécula de ácido nucleico se una operativamente a una secuencia de control de la transcripción con el fin de que sea capaz de efectuar ya sea la expresión constitutiva o regulada de la molécula de ácido nucleico cuando se transforma en una célula de levadura hospedadora. Las moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos y/u otras proteínas pueden estar en uno o más vectores de expresión unidos operativamente a una o más secuencias de control de expresión. Son secuencias de control de expresión particularmente importantes aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias de activación promotor y aguas arriba. Puede usarse cualquier promotor de levadura adecuado en la presente invención y una diversidad de dichos promotores son conocidos para los expertos en la materia. Los promotores para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, pero no se limitan a, promotores de genes que codifican las siguientes proteínas de levadura: alcohol deshidrogenasa I (ADH1) o II (ADH2), CUP1, fosfoglicerato cinasa (PGK), triosa fosfato isomerasa (TPI), factor de elongación de la traducción EF-1 alfa (TEF2), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; también denominada TDH3, para triosa fosfato deshidrogenasa), galactocinasa (GAL1), galactosa-1-fosfato uridil-transferasa (GAL7), UDP-galactosa epimerasa (GAL10), citocromo c1 (CYC1), proteína Sec7 (SEC7) y fosfatasa ácida (PHO5), incluyendo promotores híbridos tales como ADH2/GAPDH y promotores CYC1/GAL10 e incluyendo el promotor ADH2/GAPDH, que se induce cuando las concentraciones de glucosa en la célula son bajas (por ejemplo, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,2 por ciento), así como el promotor CUP1 y el promotor TEF2. Análogamente, se conoce una serie de secuencias de activación aguas arriba (SAAR), también denominadas potenciadores. Las secuencias de activación aguas arriba para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, pero no se limitan a, la SAAR de genes que codifican las siguientes proteínas: pCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 y GAL10, así como otras SAAR activadas por el producto del gen GAL4, usándose la SAAR de ADH2 en un aspecto. Puesto que la SAAR de ADH2 es activada por el producto del gen ADR1, puede ser preferible sobreexpresar el gen de ADR1 cuando un gen heterólogo está unido operativamente a la SAAR de ADH2.

Las secuencias de terminación de la transcripción para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* incluyen las secuencias de terminación de los genes de factor α , GAPDH y CYC1.

5 Las secuencias de control de la transcripción para expresar genes en la levadura metilotrófica incluyen las regiones de control de la transcripción de los genes que codifican la alcohol oxidasa y la formiato deshidrogenasa.

10 La transfección de una molécula de ácido nucleico en una célula de levadura de acuerdo con la presente invención puede realizarse por cualquier método mediante el cual se administra una molécula de ácido nucleico en la célula e incluye, pero no se limita a, difusión, transporte activo, tratamiento en baño de ultrasonidos, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción y fusión de protoplastos. Pueden integrarse moléculas de ácido nucleico transfectadas en un cromosoma de levadura o pueden mantenerse en vectores extracromosómicos usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Se desvelan en detalle ejemplos de vehículos de levadura que llevan dichas moléculas de ácido nucleico en el presente documento. Como se ha analizado anteriormente, también pueden producirse de forma recombinante citoplasto de levadura, envuelta de levadura y partículas de membrana de levadura o preparaciones de pared celular mediante la transfección de microorganismos de levadura intactos o esferoplastos de levadura con las moléculas de ácido nucleico deseadas, produciendo el antígeno en la misma y después manipulando adicionalmente los microorganismos o esferoplastos usando técnicas conocidas por los expertos en la materia para producir citoplasto, envuelta o extracto de membrana de levadura subcelular o fracciones de los mismos que contienen antígenos deseados u otras proteínas.

20 En un aspecto de la divulgación, el vehículo de levadura se manipula de manera que el antígeno se exprese o se proporcione mediante la entrega o la translocación de un producto de proteína expresado, parcial o totalmente, sobre la superficie del vehículo de levadura (expresión extracelular). Un método para realizar este aspecto es el uso de un brazo espaciador para el posicionamiento de una o más proteínas sobre la superficie del vehículo de levadura. Por ejemplo, puede usarse un brazo espaciador para crear una proteína de fusión del antígeno o antígenos u otra proteína de interés con una proteína que se dirige el antígeno o antígenos u otra proteína de interés a la pared celular de levadura. Por ejemplo, una proteína de este tipo que pueden usarse para dirigir otras proteínas es una proteína de levadura (por ejemplo, proteína de pared celular 2 (cwp2), proteína Aga2, Pir4 o Flo1) que permite que el antígeno o antígenos u otra proteína se dirija a la pared celular de levadura de manera que el antígeno u otra proteína se sitúe sobre la superficie de la levadura. Pueden usarse proteínas distintas de las proteínas de levadura para el brazo espaciador; sin embargo, para cualquier proteína de brazo espaciador, es más deseable que la respuesta inmunogénica se dirija contra el antígeno diana en lugar de la proteína de brazo espaciador. Como tal, si se usan otras proteínas para el brazo espaciador, entonces, la proteína de brazo espaciador que se use no debe generar una gran respuesta inmunitaria a la proteína de brazo espaciador en sí, de manera que la respuesta inmunitaria al antígeno o antígenos diana se vea abrumada. Un experto en la materia debería apuntar a una respuesta inmunitaria pequeña a la proteína de brazo espaciador con respecto a la respuesta inmunitaria para el antígeno o antígenos diana. Pueden construirse brazos espaciadores para que tengan sitios de escisión (por ejemplo, sitios de escisión de proteasa) que permitan que el antígeno se retire fácilmente o se procese fuera de la levadura, si se desea. Puede usarse cualquier método conocido de determinación de la magnitud de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, producción de anticuerpos, ensayos líticos, etc.) y son conocidos fácilmente para un experto en la materia.

45 Otro método para posicionar el antígeno o antígenos diana u otras proteínas que se han de exponer sobre la superficie de levadura es usar secuencias señal tales como glicosilfosfatidil inositol (GPI) para anclar la diana a la pared celular de levadura. Como alternativa, el posicionamiento puede realizarse añadiendo secuencias de señal que dirigen el antígeno o antígenos u otras proteínas de interés en la vía secretora a través de la translocación en el retículo endoplasmático (RE) de manera que el antígeno se una a una proteína que se une a la pared celular (por ejemplo, cwp).

50 En un aspecto, la proteína de brazo espaciador es una proteína de levadura. La proteína de levadura puede consistir en entre aproximadamente dos y aproximadamente 800 aminoácidos de una proteína de levadura. En una realización, la proteína de levadura tiene de aproximadamente 10 a 700 aminoácidos. En otra realización, la proteína de levadura que tiene de aproximadamente 40 a 600 aminoácidos. Otras realizaciones de la invención incluyen la proteína de levadura que tiene al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 350 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos, al menos 450 aminoácidos, al menos 500 aminoácidos, al menos 550 aminoácidos, al menos 600 aminoácidos o al menos 650 aminoácidos. En una realización, la proteína de levadura tiene al menos 450 aminoácidos de longitud.

60 El uso de proteínas de levadura puede estabilizar la expresión de proteínas de fusión en el vehículo de levadura, impide la modificación postraducciona de la proteína de fusión expresada y/o dirige la proteína de fusión a un compartimiento particular en la levadura (por ejemplo, que se ha de expresar en la superficie celular de la levadura). Para la entrega en la vía secretora de la levadura, las proteínas de levadura de ejemplo que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a: Aga (incluyendo, pero no limitada a, Agal y/o Aga2); SUC2 (invertasa de levadura); secuencia líder de señal del factor alfa; CPY; Cwp2p para su localización y retención en la pared celular; genes BUD para la localización en la yema de la célula de levadura durante la fase inicial de la formación de la célula hija; Flo1p; Pir2p; y Pir4p.

Pueden usarse otras secuencias para dirigir, conservar y/o estabilizar la proteína a otras partes del vehículo de levadura, por ejemplo, en el citosol o la mitocondria. Los ejemplos de proteína de levadura adecuada que pueden usarse para cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen, pero no se limitan a, productos de los genes SEC7; fosfoenolpiruvato carboxilasa PCK1, fosfoglicerocinasa PGK y triosa fosfato isomerasa TPI para su expresión reprimible en la glucosa y la localización citosólica; las proteínas de choque térmico SSA1, SSA3, SSA4, SSC1, cuya expresión se induce y cuyas proteínas son más termoestables tras la exposición de las células a un tratamiento térmico; la proteína mitocondrial CYC1 para la importación en mitocondrias; ACT 1.

En una realización, el control de la cantidad de glucosilación de levadura se usa para controlar la expresión de antígenos por la levadura, en particular sobre la superficie. La cantidad de glucosilación de levadura puede afectar a la inmunogenia y antigenia del antígeno expresado en la superficie, puesto que los restos de azúcar tienden a ser voluminosos. Como tal, la existencia de restos de azúcar en la superficie de la levadura y su impacto en el espacio tridimensional alrededor del antígeno o antígenos diana debe tenerse en cuenta en la modulación de la levadura de acuerdo con la invención. Puede usarse cualquier método para reducir la cantidad de glucosilación de la levadura (o aumentarla, si se desea). Por ejemplo, se podría usar una cepa de levadura mutante que se ha seleccionado para que tenga una baja glucosilación (por ejemplo, mutantes *mnn1*, *och1* y *mnn9*) o se podría eliminar mediante la mutación de las secuencias aceptoras de glucosilación sobre el antígeno diana. Como alternativa, se podría usar una levadura con patrones de glucosilación abreviados, por ejemplo, *Pichia*. También puede tratarse la levadura usando métodos que reducen o alteran la glucosilación.

En una realización de la presente invención, como alternativa a la expresión de un antígeno u otra proteína recombinante en el vehículo de levadura, un vehículo de levadura se carga intracelularmente con la proteína o péptido o con hidratos de carbono u otras moléculas que sirven como antígeno y/o son útiles como agentes inmunomoduladores o modificadores de la respuesta biológica de acuerdo con la invención. Posteriormente, el vehículo de levadura, que ahora contiene el antígeno y/u otras proteínas intracelularmente, puede administrarse al paciente o cargarse en un vehículo tal como una célula dendrítica. Pueden insertarse péptidos y proteínas directamente en vehículos de levadura de la presente invención mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, tales como por difusión, transporte activo, fusión de liposomas, electroporación, fagocitosis, ciclos hielo-deshielo y tratamiento en baños de ultrasonidos. Los vehículos de levadura que pueden cargarse directamente con péptidos, proteínas, carbohidratos u otras moléculas incluyen levadura intacta, así como esferoplastos, envueltas o citoplastos, que pueden cargarse con antígenos y otros agentes después de la producción. Como alternativa, la levadura intacta puede cargarse con el antígeno y/o agente y después pueden prepararse esferoplastos, envueltas, citoplastos o partículas subcelulares de la misma. Puede cargarse cualquier número de antígenos y/u otros agentes en un vehículo de levadura en esta realización, desde al menos 1, 2, 3, 4 o cualquier número entero hasta cientos o miles de antígenos y/u otros agentes, tal como se proporcionaría por la carga de un microorganismo o porciones del mismo, por ejemplo.

En otra realización de la presente invención, un antígeno y/u otro agente está unido físicamente al vehículo de levadura. La unión física del antígeno y/u otro agente al vehículo de levadura puede realizarse por cualquier método adecuado en la técnica, incluyendo métodos de asociación covalentes y no covalentes que incluyen, pero no se limitan a, reticular químicamente el antígeno y/u otro agente a la superficie exterior del vehículo de levadura o unir biológicamente el antígeno y/u otro agente a la superficie exterior del vehículo de levadura, tal como mediante el uso de un anticuerpo u otro compañero de unión. La reticulación química puede conseguirse, por ejemplo, mediante métodos que incluyen unión de glutaraldehído, el marcaje por fotoafinidad, el tratamiento con carbodiimidas, el tratamiento con sustancias químicas capaces de unir enlaces disulfuro y el tratamiento con otros productos químicos de reticulación convencionales en la técnica. Como alternativa, puede ponerse en contacto con el vehículo de levadura un producto químico que altere la carga de la bicapa lipídica de la membrana de la levadura o la composición de la pared celular de manera que sea más probable fusionar o unir la superficie exterior de la levadura a antígenos y/u otro agente que tengan características de carga específicas. También pueden incorporarse agentes de dirección tales como anticuerpos, péptidos de unión, receptores solubles y otros ligandos en un antígeno como una proteína de fusión o asociados de otro modo con un antígeno para la unión del antígeno al vehículo de levadura.

En otra realización más, el vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína se asocian entre sí mediante un mecanismo de unión más pasivo, no específico o no covalente, tal como mezclando suavemente el vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína juntos en un tampón u otra formulación adecuada (por ejemplo, mezcla).

En una realización de la invención, el vehículo de levadura y el antígeno u otra proteína se cargan ambos intracelularmente en un vehículo tal como una célula dendrítica o macrófago para formar la composición terapéutica o vacuna de la presente invención.

En una realización, la levadura intacta (con o sin expresión de antígenos heterólogos u otras proteínas) puede molerse o procesarse de una manera que produzca preparaciones de pared celular de levadura, partículas de membrana de levadura o fragmentos de levadura (es decir, no intacta) y los fragmentos de levadura pueden, en algunas realizaciones, proporcionarse o administrarse con otras composiciones que incluyen antígenos (por ejemplo, vacunas de ADN, vacunas de subunidades de proteínas, patógenos destruidos o inactivados) para potenciar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, puede usarse tratamiento enzimático, tratamiento químico o fuerza física (por

ejemplo, cizalla mecánica o tratamiento con ultrasonidos) para descomponer la levadura en partes que se usan como adyuvante.

5 En una realización de la invención, los vehículos de levadura útiles en la invención incluyen vehículos de levadura que se han sido destruido o inactivado. La destrucción o inactivación de la levadura puede conseguirse mediante cualquiera de una diversidad de métodos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inactivación por calor de la levadura es una forma convencional de inactivar levadura y un experto en la materia puede controlar los cambios estructurales del antígeno diana, si se desea, mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. Como alternativa, pueden usarse otros métodos de inactivación de levadura, tales como métodos químicos, eléctricos, radiactivos o de UV. Véase, por ejemplo, la metodología desvelada en libros de texto de cultivo de levadura convencionales tales como *Methods of Enzymology*, vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing (1990). Cualquiera de las estrategias de inactivación utilizadas debe tener en cuenta la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria del antígeno diana y conservar dicha estructura con el fin de optimizar su inmunogenia.

15 Las condiciones eficaces para la producción de vehículos de levadura recombinantes y la expresión del antígeno y/u otra proteína (por ejemplo, un agente como se describe en el presente documento) por el vehículo de levadura incluyen un medio eficaz en el que puede cultivarse una cepa de levadura. Un medio eficaz es normalmente un medio acuoso que comprende fuentes de hidratos de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, así como sales apropiadas, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas y factores de crecimiento. El medio puede comprender nutrientes complejos o puede ser un medio mínimo definido. Las cepas de levadura de la presente invención pueden cultivarse en una diversidad de recipientes, incluyendo, pero no limitados a, biorreactores, matraces Erlenmeyer, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. El cultivo se realiza a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para la cepa de levadura. Dichas condiciones de cultivo están bien dentro de la experiencia de un experto habitual en la técnica (véase, por ejemplo, Guthrie et al. (Editores), 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego).

30 En algunos aspectos de la invención, la levadura se cultiva en condiciones de pH neutro y, en particular, en un medio mantenido a un nivel de pH de al menos 5,5, es decir, el pH del medio de cultivo no puede caer por debajo de pH 5,5. En otros aspectos, la levadura se cultiva a un nivel de pH mantenido a aproximadamente 5,5. Un experto en la materia apreciará que el procedimiento de cultivo incluye no solo el inicio del cultivo de la levadura, sino también el mantenimiento del cultivo. Como se sabe que el cultivo de levadura se vuelve ácido con el tiempo (es decir, disminuye el pH), debe tenerse cuidado para controlar el nivel de pH durante el proceso de cultivo. Este proceso se describe en detalle en el documento WO 2008/097863, publicado el 14 de agosto de 2008.

35 Pueden formularse vehículos de levadura en composiciones inmunoterápicas a base de levadura o productos de la presente invención, incluyendo preparaciones que se han de administrar a un sujeto directamente o se han de cargar en primer lugar en un vehículo, usando una serie de técnicas conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden secarse vehículos de levadura por liofilización. También pueden prepararse formulaciones que comprenden vehículos de levadura mediante la compactación de la levadura en una torta o un comprimido, tal como se hace para la levadura utilizada en operaciones de horneado o elaboración de cerveza. Además, los vehículos de levadura pueden mezclarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tampón isotónico que sea tolerado por un hospedador o célula hospedadora. Los ejemplos de dichos excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas. También pueden usarse vehículos no acuosos, tales como aceites no volátiles, aceite de sésamo, oleato de etilo o triglicéridos. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes potenciadores de la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, glicerol o dextrano. Los excipientes también pueden contener cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Los ejemplos de tampones incluyen tampón de fosfato, tampón de bicarbonato y tampón de Tris, mientras que los ejemplos de conservantes incluyen timerosal, m- u o-cresol, formol y alcohol bencílico. Las formulaciones convencionales pueden ser inyectables líquidos o sólidos que pueden incorporarse en un líquido adecuado como una suspensión o solución para inyección. Por tanto, en una formulación no líquida, el excipiente puede comprender, por ejemplo, dextrosa, albúmina sérica humana y/o conservantes a los que pueden añadirse agua o solución salina estériles antes de la administración.

55 Antígenos útiles en las composiciones inmunoterápicas de la invención

De acuerdo con la presente invención, el uso general en el presente documento del término "antígeno" se refiere a cualquier porción de una proteína (péptido, proteína parcial, proteína de longitud completa), en la que la proteína es de origen natural o un derivado sintético, a una composición celular (célula entera, lisado de células o células alteradas), a un organismo (organismo entero, lisado o células alteradas) o a un hidrato de carbono, u otra molécula, o una porción de los mismos. Un antígeno puede, en algunas realizaciones, inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células) contra los mismos antígenos o similares que son encontrados por un elemento del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T, anticuerpos). La expresión "antígeno de cáncer" puede usarse indistintamente en el presente documento con las expresiones "antígeno específico de tumor", "antígeno asociado a tumor", "diana asociada a un cáncer" o "diana asociado a un tumor".

Un antígeno puede ser tan pequeño como un único epítipo, o más grande, y puede incluir múltiples epítipos. Como tal, el tamaño de un antígeno puede ser tan pequeño como de aproximadamente 5-12 aminoácidos (por ejemplo, un péptido) y tan grandes como: una proteína parcial, una proteína de longitud completa, incluyendo una proteína multimérica y de fusión, proteína quimérica o proteína o péptido agonista. Además, los antígenos pueden incluir hidratos de carbono.

Cuando se hace referencia a la estimulación de una respuesta inmunitaria, el término "inmunógeno" es un subconjunto del término "antígeno" y, por tanto, en algunos casos, puede usarse de forma intercambiable con el término "antígeno". Un inmunógeno, como se usa en el presente documento, describe un antígeno que induce una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células (es decir, es inmunógeno), de manera que la administración del inmunógeno a un individuo monta una respuesta inmunitaria específica de antígeno contra el mismo antígeno o similares que son encontrados por el sistema inmunitario del individuo.

Un "dominio inmunógeno" de un antígeno dado puede ser cualquier parte, fragmento o epítipo de un antígeno (por ejemplo, un fragmento o subunidad de péptido o un epítipo de anticuerpo u otro epítipo conformacional) que contenga al menos un epítipo que actúa como un inmunógeno cuando se administra a un animal. Por ejemplo, una sola proteína puede contener múltiples dominios inmunógenos diferentes. No es necesario que los dominios inmunógenos sean secuencias lineales dentro de una proteína, tal como en el caso de una respuesta inmunitaria humoral.

Un "epítipo" se define en el presente documento como un único sitio inmunógeno dentro de un antígeno dado que es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria. Los expertos en la materia reconocerán que los epítipos de linfocitos T son diferentes en tamaño y composición de los epítipos de células B, y que los epítipos presentados a través de la vía del CMH de clase I difieren de los epítipos presentados a través de la vía del CMH de clase II. Los epítipos pueden ser epítipos de secuencia lineal o conformacionales (regiones de unión conservadas).

Los antígenos útiles en cualquiera de las composiciones inmunoterápicas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier antígeno o antígenos o dominio o dominios inmunógenos de los mismos contra los cuales es deseable inducir una respuesta inmunitaria y, en particular, incluyen cualquier antígeno o antígenos o dominio o dominios inmunógenos de los mismos para los cuales una respuesta inmunitaria terapéutica contra dicho antígeno sería beneficiosa para un individuo. El antígeno puede incluir, pero no limitarse a: un antígeno de cáncer, un antígeno vírico, una molécula de superficie de célula de mamífero sobreexpresada, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno protozoario, un antígeno helmíntico, un antígeno ectoparasitario, una molécula de célula de mamífero que alberga uno o más aminoácidos mutados, una proteína expresada normalmente pre o neonatalmente por células de mamífero, una proteína cuya expresión se induce por la inserción de un agente epidemiológico (por ejemplo, virus), una proteína cuya expresión se induce por la translocación de genes y una proteína cuya expresión se induce por la mutación de secuencias reguladoras.

En un aspecto de la invención, los antígenos útiles en una o más composiciones inmunoterápicas de la invención incluyen cualquier tipo de antígeno asociado a cáncer o a tumor. En un aspecto, el antígeno incluye un antígeno asociado a un estado preneoplásico o hiperplásico. El antígeno también puede asociarse a o ser causante de cáncer. Un antígeno de este tipo puede ser un antígeno específico de tumor, un antígeno asociado a tumor (AAT) o antígeno específico de tejido, un epítipo del mismo o un agonista de epítipo del mismo. Los antígenos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, antígenos de cualquier tumor o cáncer, incluyendo, pero no limitados a, melanomas, carcinoma de células escamosas, cánceres de mama, carcinomas de cabeza y cuello, carcinomas de tiroides, sarcomas de tejidos blandos, sarcomas óseos, cánceres testiculares, cánceres de próstata, cánceres de ovario, cánceres de vejiga, cánceres de piel, cánceres de cerebro, angiosarcomas, hemangiosarcomas, tumores de mastocitos, leucemias, linfomas, cánceres hepáticos primarios, cánceres de pulmón, cánceres de páncreas, cánceres gastrointestinales (incluyendo cáncer colorrectal), carcinomas de células renales, neoplasias hematopoyéticas y cánceres metastásicos de los mismos.

Los antígenos de cáncer adecuados incluyen, pero no se limitan a, antígeno carcinoembrionario (CEA) y epítipos del mismo tales como CAP-1, CAP-1-6D (n.º de acceso de GenBank M29540 o Zaremba et al., 1997, *Cancer Research* 57: 4570-4577), MART-1 (Kawakami et al., *J. Exp. Med.* 180: 347-352, 1994), MAGE-1 (Patente de los EE.UU. N.º 5.750.395), MAGE-3, GAGE (Patente de los EE.UU. N.º 5.648.226), GP-100 (Kawakami et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 6458-6462, 1994), MUC-1 (por ejemplo, Jerome et al., *J. Immunol.*, 151: 1654-1662 (1993)), MUC-2, oncoproteína Ras mutada (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7.465.454 y 7.563.447), oncoproteínas p53 normales y mutadas (Hollstein et al., *Nucleic Acids Res.* 22: 3551-3555, 1994), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata; Israelí et al., *Cancer Res.* 53: 227-230, 1993), tirosinasa (Kwon et al *PNAS* 84: 7473-7477, 1987), TRP-1 (gp75) (Cohen et al *Nucleic Acid Res.* 18: 2807-2808, 1990; Patente de los EE.UU. N.º 5.840.839), NYESO-1 (Chen et al *PNAS* 94: 1914-1918, 1997), TRP-2 (Jackson et al., *EMBO J.* 11: 527-535, 1992), TAG72, KSA, CA125, PSA (antígeno específico de próstata; Xue et al., *The Prostate*, 30: 73-78 (1997)), HER-2/neu/c-erbB2, (Patente de los EE.UU. N.º 5.550.214), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico; Harris et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 29: 1-2 (1994)), hTERT, p73, B-RAF (serina/treonina-proteína cinasa de proto-oncogén B-Raf; Sithanandam et al., (1990), *Oncogene* 5 (12): 1775-1780), coli de poliposis adenomatosa (APC), Myc, proteína de von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógenos (AR), Smad4, MDR1

(también conocido como P-glicoproteína), Flt-3, BRCA-1 (cáncer de mama 1; Patente de los EE.UU. N.º 5.747.282), BRCA-2 (cáncer de mama 2; Patente de los EE.UU. N.º 5.747.282), Bcr-Abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, Brachyury (n.º de acceso de GenBank NP_003172.1 o NM_003181.2; Edwards et al., 1996, *Genome Res.* 6: 226-233), HERV-H (retrovirus endógeno humano H), HERV-K (retrovirus endógeno humano K), TWIST (n.º de acceso de GenBank NM_000474 y NP_000465), mesotelina (Kojima et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270 (37): 21984-90; Chang y Pastan, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1): 136-40), NGEF (nuevo gen expresado en la próstata; Bera et al., 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (9): 3059-3064; Cereda et al., 2010, *Cancer Immunol. Immunother.* 59 (1): 63-71; n.º de acceso de GenBank AAT40139 o AAT40140), modificaciones de dichos antígenos y antígenos específicos de tejido, variantes de corte y empalme de dichos antígenos y/o agonistas de epítomos de dichos antígenos. Se conocen otros antígenos de cáncer en la técnica. También pueden identificarse, aislarse y clonarse otros antígenos de cáncer mediante métodos conocidos en la técnica tales como los desvelados en la Patente de los EE.UU. N.º 4.514.506. Los antígenos de cáncer también pueden incluir uno o más factores de crecimiento y variantes de empalme de cada uno.

En un aspecto de la invención, el antígeno de cáncer es el antígeno carcinoembrionario (CEA), un polipéptido que comprende o que consiste en epítomos de los mismos tales como CAP-1, CAP-1-6D (n.º de acceso de GenBank M29540 o Zaremba et al., 1997, *Cancer Research* 57: 4570-4.577), un CEA modificado, una variante de empalme de CEA, un agonista de epítomo de dichas proteínas de CEA y/o una proteína de fusión que comprende al menos un dominio inmunógeno de CEA o un epítomo agonista del mismo. En un aspecto, el CEA es un CEA modificado correspondiente al CEA modificado que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46 en la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º US 2007_0048860, publicada el 1 de marzo de 2007, que está codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 45. En un aspecto, el antígeno es un CEA modificado que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en el presente documento, que está codificado por una secuencia de ácido nucleico representada por la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto de la invención, el antígeno es una oncogénica Ras mutada. Se han descrito oncoproteínas Ras de ejemplo, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N.º 7.465.454 y 7.563.447. Ras es un ejemplo de una oncoproteína en la que se sabe que se producen varias mutaciones en posiciones particulares y que se asocia al desarrollo de uno o más tipos de cáncer. Por tanto, se pueden construir proteínas de fusión que consisten en péptidos que contienen un resto particular que se sabe que está mutado en ciertos cánceres, en los que cada dominio contiene una mutación diferente en ese sitio con el fin de cubrir varias o todas las mutaciones conocidas en ese sitio. Una proteína de fusión útil en la presente invención puede tener uno, dos o varios dominios, en la que cada dominio se compone de un péptido de una proteína particular (las mismas o diferentes proteínas), cada péptido que consiste en al menos 4 restos de aminoácidos que flanquean cada lado de, y que incluyen, un epítomo o aminoácido mutado, tal como un aminoácido mutado que se encuentra en la proteína, en el que la mutación se asocia a una enfermedad particular (por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, con respecto a Ras, pueden proporcionarse uno, dos, tres o más dominios inmunógenos que comprenden al menos 4 aminoácidos a cada lado de, e incluyendo, la posición 12, en la que cada dominio tiene una sustitución diferente para la glicina que normalmente aparece en la proteína Ras no mutada (por ejemplo, una sustitución de una valina, una cisteína, una arginina, un aspartato, una serina o una alanina, para la glicina). Como otro ejemplo, pueden proporcionarse uno, dos, tres o más dominios inmunógenos que comprenden al menos 4 aminoácidos a cada lado de, e incluyendo, la posición 13, en la que cada dominio tiene una sustitución diferente para la glicina que normalmente aparece en la proteína Ras no mutado (por ejemplo, una sustitución de un aspartato para la glicina). Como otro ejemplo, pueden proporcionarse uno, dos, tres o más dominios inmunógenos que comprenden al menos 4 aminoácidos a cada lado de, e incluyendo, la posición 61, en la que cada dominio tiene una sustitución diferente para la glutamina que normalmente aparece en la proteína Ras no mutado (por ejemplo, una sustitución de una leucina, una arginina o una histidina, para la glutamina). En un ejemplo, el antígeno de cáncer comprende fragmentos de al menos 5-9 restos de aminoácidos contiguos de una proteína Ras de tipo silvestre que contiene las posiciones de aminoácidos 12, 13, 59, 61 o 76 con respecto a la proteína Ras de tipo silvestre, en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 12, 13, 59, 61 o 76 están mutados con respecto a la proteína Ras de tipo silvestre. En un aspecto, la construcción de proteína de fusión se compone de al menos un péptido que se fusiona en marco con otro antígeno tumoral mutado (por ejemplo, una proteína Ras que comprende al menos una mutación con respecto a una secuencia de la proteína Ras de tipo silvestre), en la que el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en: (a) un péptido que comprende al menos las posiciones 8-16 de Ras de tipo silvestre (K-ras, N-Ras o H-Ras humanas o murinas), en el que el resto de aminoácido en la posición 12 con respecto a la Ras de tipo silvestre está mutado en comparación con Ras de tipo silvestre; (b) un péptido que comprende al menos las posiciones 9-17 de Ras de tipo silvestre, en el que el resto de aminoácido en la posición 13 con respecto a Ras de tipo silvestre está mutado en comparación con Ras de tipo silvestre; (c) un péptido que comprende al menos las posiciones 55-63 de Ras de tipo silvestre, en el que el resto de aminoácido en la posición 59 con respecto a la SEQ ID NO: 3 está mutado en comparación con Ras de tipo silvestre; (d) un péptido que comprende al menos las posiciones 57-65 de Ras de tipo silvestre, en el que el resto de aminoácido en la posición 61 con respecto a Ras de tipo silvestre está mutado en comparación con Ras de tipo silvestre; o (e) un péptido que comprende al menos las posiciones 72-80 de Ras de tipo silvestre, en el que el resto de aminoácido en la posición 76 con respecto a Ras de tipo silvestre está mutado en comparación con Ras de tipo silvestre. Se destaca que estas posiciones son idénticas entre K-Ras, N-Ras y H-Ras humanas y de ratón, puesto que las secuencias humanas y de ratón son idénticas en esta región de la proteína y puesto que K-Ras, H-Ras y N-Ras son idénticas en esta región. En un aspecto, la proteína de fusión Ras adecuada para su uso como un antígeno

en la presente invención se selecciona entre: la SEQ ID NO: 4 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 3), la SEQ ID NO: 6 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 5), la SEQ ID NO: 8 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 7) y/o la SEQ ID NO: 10 (codificada por una secuencia de ácido nucleico representada en el presente documento como SEQ ID NO: 9).

En un aspecto de la invención, el antígeno es Brachyury humano. La secuencia de aminoácidos para Brachyury humano se representa en el presente documento por la SEQ ID NO: 15, que está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por la SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto de la invención, los antígenos útiles en una o más composiciones inmunoterápicas de la invención incluyen cualquier antígeno asociado a un patógeno o una enfermedad o afección provocada por o asociada a un patógeno. Dichos antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos víricos, antígenos fúngicos, antígenos bacterianos, antígenos helmínticos, antígenos parasitarios, antígenos ectoparasitarios, antígenos protozoarios o antígenos de cualquier otro agente infeccioso.

En un aspecto, el antígeno es de virus, incluyendo, pero no limitado a, adenovirus, arena virus, bunyavirus, coronavirus, virus coxsackie, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, flavivirus, hepadnavirus, virus de la hepatitis, virus del herpes, virus de la gripe, lentivirus, virus del sarampión, virus de las paperas, mixovirus, ortomixovirus, virus del papiloma, papovavirus, virus paragripal, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, virus de la viruela, virus de la rabia, virus respiratorio sincitial, reovirus, rhabdovirus, virus de la rubeola, togavirus y virus de varicela. Otros virus incluyen virus linfotróficos T, tales como virus linfotróficos de linfocitos T humanos (HTLV, tales como HTLV-I y HTLV-II), virus de la leucemia bovina (BLVS) y virus de la leucemia felina (FLV). Los lentivirus incluyen, pero no se limitan a, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, incluyendo el VIH-1 o VIH-2), de simios (SIV), felina (VIF) y canina (CIV). En una realización, los antígenos víricos incluyen los de los virus no oncogénicos.

En otro aspecto, el antígeno es de un agente infeccioso de un género seleccionado entre: *Aspergillus*, *Bordetella*, *Brugia*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidia*, *Cryptococcus*, *Dirofilaria*, *Escherichia*, *Francisella*, *Gonococcus*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Paramecium*, *Pertussis*, *Plasmodium*, *Pneumococcus*, *Pneumocystis*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Toxoplasma*, *Vibrio* *cholerae* y *Yersinia*. En un aspecto, el agente infeccioso se selecciona entre *Plasmodium falciparum* o *Plasmodium vivax*.

En un aspecto, el antígeno es de una bacteria de una familia seleccionada entre: Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, Vibrionaceae, Pasteurellaceae, Mycoplasmataceae y Rickettsiaceae. En un aspecto, la bacteria es de un género seleccionado entre: *Pseudomonas*, *Bordetella*, *Mycobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Francisella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Pasteurella* y *Yersinia*. En un aspecto, la bacteria es de una especie seleccionada entre: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enteric*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* y *Bordetella bronchiseptica*.

En un aspecto, el antígeno es de un hongo, incluyendo un hongo de este tipo, pero sin limitación, un hongo de *Saccharomyces spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Coccidioides spp.*, *Neurospora spp.*, *Histoplasma spp.* o *Blastomyces spp.* En un aspecto, el hongo es de una especie seleccionada entre: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii* o *Cryptococcus neoformans*. Las especies más comunes de *Aspergillus* que provocan enfermedad invasiva incluyen *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans* y pueden encontrarse, por ejemplo, en pacientes que tienen inmunosupresión o deficiencia de linfocitos T o alteración fagocítica. *A. fumigatus* se ha implicado en asma, aspergilomas y aspergilosis invasiva. La coccidioidomycosis, también conocida como fiebre del valle de San Joaquín, es una enfermedad fúngica provocada por *Coccidioides immitis* y puede conducir a infecciones respiratorias agudas y afecciones pulmonares crónicas o diseminación a las meninges, los huesos y las articulaciones. Las afecciones asociadas a criptococosis también son objetivo de los métodos de la invención, por ejemplo, en un sujeto no inmunosuprimidos o inmunosuprimidos, tal como un sujeto que está infectado con el VIH.

En algunas realizaciones, el antígeno es una proteína de fusión. En un aspecto de la invención, una proteína de fusión puede incluir dos o más antígenos. En un aspecto, la proteína de fusión puede incluir dos o más dominios inmunógenos y/o dos o más epítopos de uno o más antígenos. Cualquier combinación de antígenos, dominios inmunógenos de los mismos y/o epítopos de los mismos se contemplan para su uso en las composiciones de la invención. Una composición inmunoterápica que contiene dichos antígenos, dominios inmunógenos de los mismos y/o epítopos de los mismos puede proporcionar la inmunización específica de antígeno en una amplia gama de pacientes. Por ejemplo, una proteína de fusión útil en la presente invención puede tener múltiples dominios (dos o más dominios), en la que cada dominio se compone de un péptido o polipéptido de una proteína particular, consistiendo el péptido o polipéptido en al menos 4 restos de aminoácidos que flanquean cada lado de, y que incluyen, un aminoácido mutado que se encuentra en la proteína, en la que la mutación se asocia a una enfermedad o afección particular.

En una realización, se producen proteínas de fusión que se usan como un componente de la composición inmunoterápica a base de levadura útil en la invención usando construcciones que son particularmente útiles para la expresión de antígenos heterólogos en la levadura. Normalmente, la proteína o proteínas o péptido o péptidos deseados antigénicos se fusionan en su extremo amino terminal con: (a) un péptido sintético específico que estabiliza la expresión de la proteína de fusión en el vehículo de levadura o impide la modificación postraducciona

5 de la proteína de fusión expresada (dichos péptidos se describen en detalle, por ejemplo, en la publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2004-0156858 A1, publicada el 12 de agosto de 2004); (b) al menos una porción de una proteína de levadura endógena, en la que cualquiera de los compañeros de fusión proporciona una estabilidad significativamente potenciada de la expresión de la proteína en la levadura y/o impide la modificación

10 postraducciona de las proteínas por las células de levadura (dichas proteínas también se describen en detalle, por ejemplo, en la publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2004-0156858 A1, citada anteriormente); y/o (c) al menos una porción de una proteína de levadura que provoca que la proteína de fusión se exprese en la superficie de la levadura (por ejemplo, una proteína Aga, como se describe en detalle en el documento WO 2008/019366). Además, la presente invención incluye el uso de péptidos que se fusionan con el extremo C terminal de la construcción que

15 codifica el antígeno, en particular para su uso en la selección e identificación de la proteína. Dichos péptidos incluyen, pero no se limitan a, cualquier péptido sintético o natural, tal como un péptido marcador (por ejemplo, 6X His) o cualquier otro marcador de epítipo corto. Pueden usarse péptidos unidos al extremo C de un antígeno de acuerdo con la invención con o sin la adición de los péptidos N terminales analizados anteriormente.

20 De acuerdo con la invención, las dos o más composiciones inmunoterápicas diferentes se dirigen al mismo antígeno o antígenos. En esta realización, el mismo antígeno o antígenos o dominio o dominios inmunógenos de los mismos son expresados normalmente por cada uno de los vectores de la composición inmunoterápica, aunque el antígeno o antígenos y/o dominio o dominios inmunógenos de los mismos pueden mezclarse con una o las dos composiciones, y/o en el caso de la composición inmunoterápica a base de levadura, el antígeno puede estar unido al vehículo de

25 levadura y/o llevarse al interior del vehículo de levadura. En otra realización, se proporciona una combinación de un tipo de composición inmunoterápica, en la que existen al menos dos composiciones antigénicas diferentes dentro del mismo tipo (por ejemplo, una combinación de una composición inmunoterápica a base de levadura que expresa Ras mutada o una proteína de fusión que comprende múltiples dominios inmunógenos de Ras mutada, y una composición inmunoterápica a base de levadura que expresa CEA o un CEA modificado como se describe en el

30 presente documento). Esta combinación se administra simultáneamente con el otro tipo de composición inmunoterápica (por ejemplo, una composición a base de virus) que expresa el mismo antígeno o antígenos. En un aspecto de una realización de este tipo, las diversas combinaciones pueden mezclarse o, en otro aspecto, no necesitan mezclarse físicamente, sino que más bien pueden administrarse simultáneamente tal como al mismo sitio o sitios diferentes o dentro del mismo periodo de administración.

35 Métodos de uso de las composiciones de la invención

En los métodos de la presente invención, se administran en primer lugar dos o más composiciones inmunoterápicas como se describen en el presente documento simultáneamente a un individuo. Como se usa en la presente memoria

40 con respecto a la administración de una composición, el término "simultáneamente" significa administrar cada una de las composiciones y, en particular, la primera dosis de dichas composiciones, esencialmente al mismo tiempo o dentro del mismo periodo de dosificación o dentro de un periodo de tiempo durante el cual se producen los efectos iniciales de sensibilización del sistema inmunitario por las composiciones inmunoterápicas (por ejemplo, en el plazo de 1-2 días y preferentemente menos). Para mayor claridad, la administración simultánea no requiere la

45 administración de todas las composiciones precisamente en el mismo momento, sino más bien, la administración de todas las composiciones debe ocurrir dentro de una dosificación programada del paciente con el fin de sensibilizar el sistema inmunitario con cada una de las composiciones simultáneamente (por ejemplo, puede administrarse en primer lugar una composición, seguida inmediatamente o cercana a la administración de la segunda composición y así sucesivamente). En algunas circunstancias, tal como cuando las composiciones se administran al mismo sitio,

50 las composiciones pueden proporcionarse mezcladas, aunque incluso cuando se administran en el mismo sitio, puede ser preferible la administración secuencial de cada composición durante el mismo periodo de dosificación. En un aspecto, las composiciones se administran dentro de los mismos 1-2 días y, en un aspecto, en el mismo día y, en un aspecto, dentro del mismo periodo de 12 horas y, en un aspecto, dentro del mismo periodo de 8 horas y, en un aspecto, dentro del mismo periodo de 4 horas y, en un aspecto, dentro del mismo periodo de 1, 2 o 3 horas y, en un

55 aspecto, dentro de los mismos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos.

En algunas circunstancias, ya sea la primera o la segunda composición inmunoterápica se administra más frecuentemente que la otra. Por ejemplo, en un aspecto, cuando la primera composición inmunoterápica es una

60 composición inmunoterápica a base de virus y la segunda composición inmunoterápica es una composición inmunoterápica a base de levadura, la segunda composición inmunoterápica pueden administrarse más frecuentemente que la primera composición inmunoterápica. Por ejemplo, en un aspecto, entre las administraciones simultáneas de la composición inmunoterápica primera y segunda, la segunda composición inmunoterápica puede administrarse una, dos, tres o más veces adicionales. Por ejemplo, debido a que la inmunización con la composición

65 inmunoterápica a base de virus da como resultado la presentación prolongada de antígeno, puede que no sea necesario o beneficioso administrar esta composición en frecuencias más cortas, mientras que las composiciones inmunoterápicas a base de levadura presentan bolo individual de antígeno y de este modo pueden administrarse

más frecuentemente sin el temor de inhibir la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, en un aspecto, la composición inmunoterápica a base de virus se administra cada 2, 3 o 4 o más semanas, mientras que las composiciones inmunoterápicas a base de levadura se administran en intervalos de 1 semana, que pueden prolongarse a intervalos más largos (2, 3 o 4 semanas o más) como periodo total de aumentos de terapia.

5 En una realización de la invención, las dos o más composiciones inmunoterápicas se administran simultáneamente, pero en diferentes sitios físicos en el paciente. Por ejemplo, una composición puede administrarse en un sitio en un lado del cuerpo del individuo y la otra composición puede administrarse en un sitio en el otro lado del cuerpo del individuo. Como otro ejemplo, una composición puede administrarse en un sitio cerca de un ganglio linfático de drenaje particular y la otra composición puede administrarse en un sitio cerca de un ganglio linfático de drenaje diferente. En otra realización, las dos o más composiciones inmunoterápicas diferentes se administran simultáneamente y en los mismos sitios o en sitios sustancialmente adyacentes en el paciente. Un sitio sustancialmente adyacente es un sitio que no es precisamente el mismo sitio de inyección en el que se administra la primera composición, pero que está en estrecha proximidad (está al lado o cerca de) el primer sitio de inyección. En una realización, las dos o más composiciones inmunoterápicas diferentes se administran en mezcla. En un aspecto de la invención, una composición inmunoterápica a base de virus se administra por vía subcutánea, intramuscular o intratumoral y una composición a base de levadura de la invención se administra por vía subcutánea.

20 Algunas realizaciones pueden incluir combinaciones de los enfoques de administración. Por ejemplo, usando el caso de ejemplo de la administración simultánea de una composición inmunoterápica a base de levadura (una primera composición) y una composición inmunoterápica a base de virus (una segunda composición), una porción de la dosis de la composición a base de levadura (por ejemplo, una fracción de la dosis total de la composición a base de levadura) puede administrarse en mezcla con, o en el mismo sitio o en un sitio adyacente, en forma de una porción o de la totalidad de la dosis de la composición inmunoterápica a base de virus y, después, la porción o porciones restantes de la dosis de la composición inmunoterápica a base de levadura se administran en otro sitio o sitios en el individuo. De forma similar, una porción de la dosis de la composición a base de virus puede administrarse en mezcla con, o en el mismo sitio o en un sitio adyacente, como una porción o la totalidad de la dosis de la composición a base de levadura y después la porción o porciones restantes de la composición inmunoterápica a base de virus se administran en otro sitio o sitios en el individuo. En una realización, dentro de una cantidad de dosis única de composición inmunoterápica a base de virus y/o a base de levadura que se ha de administrar en porciones en diferentes sitios en el individuo, algunas porciones pueden contener o expresar el antígeno diana y otros no (es decir, los otros pueden ser vectores vacíos o pueden codificar una molécula coestimuladora, citocinas u otro agente no antigénico).

35 La administración de una vacuna o composición puede ser sistémica, por vía mucosa y/o próxima a la ubicación del sitio diana (por ejemplo, cerca de un tumor). Las vías preferidas de administración serán evidentes para los expertos en la materia, dependiendo del tipo de afección que se ha de prevenir o tratar, el antígeno utilizado y/o la población de células o tejido diana. Los diversos métodos aceptables de administración incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intranodal, administración intracoronaria, administración intraarterial (por ejemplo, en una arteria carótida), administración subcutánea, entrega transdérmica, administración intratraqueal, administración subcutánea, administración intraarticular, administración intraventricular, inhalación (por ejemplo, aerosol), por vía intracraneal, intraespinal, intraocular, aural, intranasal, oral, administración pulmonar, impregnación de un catéter e inyección directa en un tejido. En un aspecto, las vías de administración incluyen: la vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intranodal, intramuscular, transdérmica, inhalada, intranasal, oral, intraocular, intraarticular, intracraneal e intraespinal. La entrega parenteral puede incluir las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intrapulmonar, intravenosa, subcutánea, por catéter auricular y catéter venoso. La entrega aural puede incluir gotas para los oídos, la entrega intranasal puede incluir gotas nasales o inyección intranasal y la entrega intraocular puede incluir colirios. La entrega por aerosol (inhalación) también puede realizarse usando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 189: 11277-11281, 1992). Otras vías de administración que modulan la inmunidad de la mucosa son útiles en el tratamiento de infecciones víricas. Dichas vías incluyen las vías bronquial, intradérmica, intramuscular, intranasal, otra inhalatoria, rectal, subcutánea, tópica, transdérmica, vaginales y uretrales. En un aspecto, una composición inmunoterápica de la invención se administra por vía subcutánea. Los métodos preferidos de administración incluyen, pero no se limitan a, las vías intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intranodal, intramuscular, transdérmica o intratumoral. La dosis se administra al menos una vez. Las dosis posteriores pueden administrarse como se indica y normalmente se utilizan.

60 Más en particular, en una realización, la administración simultánea inicial de las dos o más composiciones inmunoterápicas diferentes de la invención puede ir seguida de dosis de refuerzo posteriores de una y, en una realización, ambas o todas, las composiciones inmunoterápicas. Pueden administrarse dosis de refuerzo (refuerzos) separadas por cualquier periodo de tiempo adecuado y, normalmente, se administran con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 semanas de diferencia. Las dosis de refuerzo de las dos o más composiciones inmunoterápicas pueden administrarse simultáneamente o por separado, según se desee, pero más normalmente se administran simultáneamente, como con la dosis de sensibilización. Al igual que con la dosis de sensibilización, el método de administración puede usar cualquier combinación de sitios y estrategias de administración como se han descrito anteriormente para la dosis de sensibilización, pero no se limita al mismo protocolo de administración que para la

dosis de sensibilización. Por ejemplo, si las dosis de sensibilización se administraron en dos sitios diferentes (una composición inmunoterápica en cada sitio), las dosis de refuerzo pueden administrarse en los mismos dos sitios, en un sitio individual o en sitios adyacentes, o en dos sitios diferentes, o usando la estrategia de división en porciones descrita anteriormente.

5 Además, no es necesario que las dosis de refuerzo se formulen exactamente de la misma manera que las dosis de sensibilización. Por ejemplo, si cada una de las composiciones inmunoterápicas en la dosis de sensibilización proporcionó un antígeno o antígenos y/o dominio o dominios inmunógenos de los mismos, en la dosis de refuerzo, ambas composiciones inmunoterápicas pueden volver a proporcionar el antígeno o antígenos y/o dominio o dominios inmunógenos de los mismos, o solo una de las composiciones inmunoterápicas pueden proporcionar el antígeno o antígenos y/o dominio o dominios inmunógenos de los mismos, y la otra composición inmunoterápica puede ser un vector vacío o proporcionar agentes no antigénicos (por ejemplo, moléculas inmunoestimuladoras u otros agentes). Otra posible modificación de las composiciones como se describen en el presente documento también se contempla durante la fase de refuerzo, incluyendo modificaciones o cambios en el vector vírico utilizado (por ejemplo, usando virus variolovacunal en una composición de sensibilización y virus de la viruela aviar en una composición de refuerzo, o viceversa), modificaciones o cambios en un vehículo de levadura (por ejemplo, el cambio en la cepa de levadura, el cambio en el método de producción de levadura, el cambio en cómo la levadura proporciona el antígeno, tal como expresado frente a en mezcla), cantidades de dosis, antígenos o dominios proporcionados por una o más de las composiciones y la inclusión o eliminación o sustitución de moléculas inmunoestimuladoras u otros agentes.

La expresión "dosis unitaria" en lo que respecta al inóculo de una composición de la invención se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas en forma de dosificaciones unitarias para mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de composición inmunoterápica calculada para producir el efecto inmunógeno deseado en asociación con el diluyente requerido. Las especificaciones para la dosis unitaria nueva de un inóculo de la presente invención están dictadas por y dependen de las características únicas de la composición inmunoterápica particular y el efecto inmunológico particular que se ha de conseguir. Al proporcionar a un individuo una composición inmunoterápica de la presente invención, preferentemente un ser humano, la dosis de vector recombinante administrada variará dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, el estado médico general, la anamnesis previa, la progresión de la enfermedad, la carga tumoral, la cantidad de patógenos y similares del individuo.

El inóculo se prepara normalmente como una solución en un diluyente tolerable (aceptable) tal como solución salina, solución salina con fosfato u otro diluyente fisiológicamente tolerable y similares para formar una composición farmacéutica acuosa.

Con respecto a las composiciones inmunoterápicas a base de virus recombinante de la invención, en general, es deseable proporcionar al receptor una dosis de virus recombinante en el intervalo de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de placa, aunque puede administrarse una dosis menor o mayor, incluyendo, pero no limitada a, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o más unidades formadoras de placa. Los ejemplos de métodos para administrar el vector vírico recombinante en individuos incluyen, pero no se limitan a, la exposición de las células tumorales al virus recombinante *ex vivo* o inyección del vector recombinante en el hospedador afectado mediante administración intravenosa, subcutánea (S.C.), intradérmica (I.D.) o intramuscular (I.M.) del virus. Como alternativa, el vector vírico recombinante o la combinación de vectores víricos recombinantes pueden administrarse localmente mediante inyección directa en una lesión cancerosa o tumor o aplicación tópica en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad de vector recombinante que lleva la secuencia de ácido nucleico de uno o más antígenos en combinación con secuencias de ácido nucleico que codifican múltiples moléculas coestimuladoras que se han de administrar se basa en el título de partículas víricas. Un intervalo preferido del antígeno que se ha de administrar es de 10^5 a 10^{10} partículas víricas por mamífero, preferentemente un ser humano, aunque puede administrarse una dosis más baja o más alta, incluyendo, pero no limitada a, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o más unidades formadoras de placa.

Con respecto a las composiciones inmunoterápicas a base de levadura de la invención, en general, una dosis única adecuada es una dosis que es capaz de proporcionar eficazmente un vehículo de levadura y un antígeno (si se incluye) a un tipo celular, tejido o región determinados del cuerpo del paciente en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno, cuando se administra una o más veces durante un periodo de tiempo adecuado. Por ejemplo, en una realización, una dosis única de un vehículo de levadura de la presente invención es de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^7 equivalentes de células de levadura por kilogramo de peso corporal del organismo al que se le administra la composición. Más preferentemente, una dosis única de un vehículo de levadura de la presente invención es de aproximadamente 0,1 U.L. (1×10^6 células) a aproximadamente 100 U.L. (1×10^9 células) por dosis (es decir, por organismo), incluyendo cualquier dosis provisional, en incrementos de $0,1 \times 10^6$ células (es decir, $1,1 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$, $1,3 \times 10^6$...). Las dosis preferidas incluyen dosis entre 1 U.L. y 40 U.L. y, más preferentemente, entre 10 U.L. y 40 U.L. En una realización, las dosis se administran en diferentes sitios en el individuo, pero durante el mismo periodo de dosificación. Por ejemplo, puede administrarse una dosis de 40 U.L. a través de inyección de dosis de 10 U.L. en cuatro sitios diferentes en el individuo durante un periodo de dosificación.

Si el mamífero que se ha de inmunizar ya padece una enfermedad (por ejemplo, cáncer o cáncer metastásico o una infección patógena crónica), la vacuna puede administrarse junto con otros tratamientos terapéuticos utilizados para tratar la enfermedad (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia, terapia de moléculas pequeñas, terapia de citocinas, terapia antivírica, terapia modificadora de la respuesta biológica, cirugía, etc.), además de la administración simultánea de las diferentes composiciones inmunoterápicas que se describen en el presente documento.

El método de uso de las composiciones inmunoterápicas de la presente invención induce una respuesta inmunitaria en un individuo de manera que el individuo está protegido de la enfermedad o afección o de síntomas que dan como resultado la enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, la frase "protegido de una enfermedad" se refiere a prevenir una enfermedad, prevenir al menos un síntoma de la enfermedad, retrasar la aparición de una enfermedad, reducir uno o más síntomas de la enfermedad, reducir la aparición de la enfermedad y/o reducir la gravedad de la enfermedad. Con respecto al cáncer, la administración simultánea de las composiciones inmunoterápicas de la invención preferentemente dan como resultado uno o más de: la prevención del crecimiento tumoral, el retraso de la aparición de la enfermedad, la reducción de la carga tumoral, la reducción del crecimiento del tumor, el aumento de la supervivencia, la mejora de la función del órgano y/o la mejora de la salud general del individuo. Con respecto a las enfermedades infecciosas y otras enfermedades, la administración simultánea de las composiciones inmunoterápicas preferentemente da como resultado uno o más de: la prevención de la enfermedad o afección, la prevención de la infección, el retraso de la aparición de la enfermedad, el aumento de la supervivencia, la reducción de la carga de patógenos (por ejemplo, la reducción del título vírico), la reducción de al menos un síntoma resultante de la infección en el individuo, la reducción del daño del órgano o sistema resultante de la infección o enfermedad y la mejora en el órgano o sistema de la función.

En el método de tratamiento la administración de las composiciones inmunoterápicas de la invención puede ser "profiláctica" o "terapéutica". Cuando se proporciona profilácticamente, las composiciones inmunoterápicas de la presente invención se proporcionan antes de cualquier síntoma de una enfermedad o afección. La administración profiláctica de las composiciones inmunoterápicas sirve para prevenir o mejorar o retrasar el tiempo hasta la aparición de cualquier enfermedad posterior. Cuando se proporcionan terapéuticamente, las composiciones inmunoterápicas se proporcionan en o después de la aparición de un síntoma de la enfermedad. El término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de la salud normal de un animal e incluye un estado cuando los síntomas de la enfermedad están presentes, así como afecciones en las que se ha producido una desviación (por ejemplo, crecimiento tumoral, infección, etc.), pero los síntomas aún no se han manifestado.

En cualquier realización de la invención, además de la administración de las composiciones inmunoterápicas de la invención a un individuo, pueden administrarse inmunomoduladores exógenos o moléculas inmunoestimuladoras, fármacos quimioterapéuticos, antibióticos, fármacos antifúngicos, fármacos antivíricos, terapias contra el cáncer, citocinas y otros agentes terapéuticos, composiciones terapéuticas o protocolos terapéuticos adicionales, solos o en combinación, dependiendo de la afección que se ha de tratar. Los modificadores adecuados de la respuesta biológica que pueden usarse junto con las composiciones inmunoterápicas de la invención incluyen, pero no se limitan a, citocinas, quimiocinas, hormonas, derivados lipídicos, péptidos, proteínas, polisacáridos, fármacos de moléculas pequeñas, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos anticitocinas, anticuerpos del receptor anticitocinas, anticuerpos antiquimiocinas), vitaminas, polinucleótidos, restos de unión a ácidos nucleicos, aptámeros y moduladores de crecimiento. Los ejemplos de agentes añadidos exógenamente y modificadores de la respuesta biológica incluyen, pero no se limitan a, Flt-3L, ciclofosfamida, cisplatino, ganciclovir, anfotericina B, 5-fluorouracilo, interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), IL-6, interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interferón de tipo I (incluyendo IFN- α) o agonistas o antagonistas de interferón de tipo I o un receptor del mismo; interferón de tipo II (incluyendo IFN- γ) o agonistas o antagonistas de interferón de tipo II o un receptor del mismo; interferón de tipo III (incluyendo IFN- λ) o agonistas o antagonistas de interferón de tipo III o un receptor del mismo; factor de necrosis tumoral α (TNF- α); factor de crecimiento transformante β (TGF- β); anti-CD40; CD40L; anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, para liberar linfocitos T anérgicos); coestimuladores de linfocitos T (por ejemplo, anti-CD 137, anti-CD28, anti-CD40); alemtuzumab (por ejemplo, Campath®), denileucina diftitox (por ejemplo, ONTAK®); anti-CD4; anti-CD25; anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2; agentes que bloquean FOXP3 (por ejemplo, para anular la actividad/inactivar linfocitos T reguladores CD4+/CD25+); ligando de Flt3, imiquimod (Aldara™), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), sargramostim (Leukine®); hormonas incluyendo sin limitación prolactina y hormona del crecimiento; agonistas del receptor de tipo Toll (TLR), incluyendo pero no limitado a agonistas de TLR-2, agonistas de TLR-4, agonistas de TLR-7 y agonistas de TLR-9; antagonistas de TLR, incluyendo pero no limitados a antagonistas de TLR-2, antagonistas de TLR-4, antagonistas de TLR-7 y antagonistas de TLR-9; agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores, incluyendo pero no limitados a, inhibidores de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib, AINE), glucocorticoides, estatinas y talidomida y análogos de los mismos incluyendo IMiD™ (que son análogos estructurales y funcionales de la talidomida (por ejemplo, REVLIMID® (lenalidomida), ACTIMID® (pomalidomida)); agentes proinflamatorios, tales como componentes fúngicos o bacterianos o cualquier citocina o quimiocina proinflamatoria; vacunas inmunoterápicas incluyendo, pero no limitadas a, vacunas a base de virus, vacunas a base de bacterias o vacunas a base de anticuerpos; y cualquier otro agente inmunomodulador, inmunopotenciador, antiinflamatorio y/o agente proinflamatorio.

Estos agentes exógenos y terapias pueden administrarse simultáneamente con las composiciones inmunoterápicas de la invención o en diferentes puntos temporales. Por ejemplo, cuando se proporcionan a un individuo junto con quimioterapia, puede ser deseable administrar las composiciones inmunoterápicas durante el "descanso" entre las dosis de quimioterapia, con el fin de maximizar la eficacia de las composiciones inmunoterápicas.

5 Las composiciones y vacunas terapéuticas de la invención pueden incluir adicionalmente cualquier otro compuesto que sea útil para proteger a un sujeto de una enfermedad o afección particular, incluyendo una infección por un patógeno, cualquier compuesto que trate o mejore cualquier síntoma de una infección de este tipo y cualquier compuesto o tratamiento para el cáncer.

10 En el método de la presente invención, las composiciones y composiciones terapéuticas pueden administrarse a animales, incluyendo cualquier vertebrado y, en particular, a cualquier miembro de la clase de los vertebrados, mamíferos, incluyendo, sin limitación, primates, roedores, ganado y mascotas domésticas. El ganado incluye mamíferos que se han de consumir o que producen productos útiles (por ejemplo, ovejas para la producción de lana). Los mamíferos que se protegen incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, cabras, ovejas, vacas, caballos y cerdos.

Técnicas generales útiles en la invención

20 La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que son bien conocidas para los expertos en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, *Methods of Enzymology*, vol. 194, Guthrie et al., editores, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *Biology and activities of yeasts*, Skinner, et al., editores, Academic Press (1980);
 25 *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*, Rose et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*, Pringle et al., editores, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); *The Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, Jones et al., editores, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); *The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*, Broach et al., editores, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook et al., 1989) y *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (denominados conjuntamente en el presente documento "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., editores, 1987, incluyendo los suplementos de 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., editores, 1994); Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (denominados conjuntamente en el presente documento "Harlow y Lane"), Beaucage et al. editores, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000); *Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons*, C. Klaassen, editor, 6a edición (2001) y *Vaccines*, S. Plotkin y W. Orenstein, editores, 3a edición (1999).

40 Definiciones generales

Una "composición inmunoterápica" es una composición que induce una respuesta inmunitaria suficiente para conseguir al menos un beneficio terapéutico en un sujeto.

45 En general, la expresión "biológicamente activo" indica que un compuesto tiene al menos una actividad detectable que tiene un efecto sobre el metabolismo u otros procesos de una célula u organismo, como se mide o se observa *in vivo* (es decir, en un entorno fisiológico natural) o *in vitro* (es decir, en condiciones de laboratorio). En consecuencia, una porción o fragmento o dominio biológicamente activo de una proteína, por ejemplo, se refiere a una porción, fragmento o dominio que es de tamaño suficiente para tener una actividad biológica de la proteína de longitud completa. Dicha actividad es una actividad que es particular para esa proteína, en lugar de una actividad de todas las proteínas como una clase.

50 Un "individuo" o un "sujeto" o "paciente", términos que pueden usarse indistintamente, es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, animales de deporte, mascotas, primates, ratones y ratas.

De acuerdo con la presente invención, el término "modular" pueden usarse indistintamente con "regular" y se refiere en general a la regulación positiva o a la regulación negativa de una actividad en particular. Como se usa en el presente documento, la expresión "regular positivamente" puede usarse en general para describir cualquiera de:
 60 inducir, iniciar, aumentar, incrementar, reforzar, mejorar, potenciar, amplificar, promover o proporcionar, con respecto a una actividad particular. De forma similar, la expresión "regular negativamente" puede usarse en general para describir cualquiera de: disminuir, reducir, inhibir, mejorar, disminuir, reducir, bloquear o prevenir, con respecto a una actividad particular.

65 La referencia a una proteína o polipéptido aislados en la presente invención incluye proteínas de longitud completa, proteínas de fusión o cualquier fragmento, dominio, epítipo conformacional u homólogo de dichas proteínas. Más

- específicamente, una proteína aislada, de acuerdo con la presente invención, es una proteína (incluyendo un polipéptido o péptido) que se ha retirado de su medio natural (es decir, que ha sido objeto de manipulación humana) y puede incluir proteínas purificadas, proteínas parcialmente purificadas, proteínas producidas de forma recombinante y proteínas producidas de forma sintética, por ejemplo. Como tal, "aislada" no refleja el grado en el que la proteína se ha purificado. Preferentemente, una proteína aislada de la presente invención se produce de forma recombinante. De acuerdo con la presente invención, los términos "modificación" y "mutación" pueden usarse indistintamente, en particular con respecto a las modificaciones/mutaciones de la secuencia de aminoácidos de proteínas o porciones de las mismas (o secuencias de ácido nucleico) que se describen en el presente documento.
- Como se usa en el presente documento, el término "homólogo" se usa para referirse a una proteína o péptido que difiere de una proteína o péptido de origen natural (es decir, la proteína "prototipo" o "de tipo silvestre") por modificaciones menores con la proteína o péptido de origen natural, pero que mantiene la estructura básica de proteína y cadena lateral de la forma de origen natural. Dichos cambios incluyen, pero no se limitan a: cambios en una o unas pocas cadenas laterales de aminoácidos; cambios en uno o unos pocos aminoácidos, incluyendo deleciones (por ejemplo, una versión truncada de la proteína o péptido) inserciones y/o sustituciones; cambios en la estereoquímica de uno o unos pocos átomos; y/o derivatizaciones menores, incluyendo pero no limitadas a: metilación, glucosilación, fosforilación, acetilación, miristoilación, prenilación, palmitación, amidación y/o adición de glicosilfosfatidil inositol. Un homólogo puede tener propiedades mejoradas, disminuidas o sustancialmente similares en comparación con la proteína o péptido de origen natural. Un homólogo puede incluir un agonista de una proteína o un antagonista de una proteína. Pueden producirse homólogos usando técnicas conocidas en la técnica para la producción de proteínas incluyendo, pero no limitadas a, modificaciones directas de la proteína aislada de origen natural, síntesis directa de proteínas o modificaciones de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína usando, por ejemplo, técnicas de ADN clásicas o recombinantes para efectuar mutagénesis aleatoria o dirigida.
- Un homólogo de una proteína dada puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en, una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente el 45 %, o al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 55 %, o al menos aproximadamente el 60 %, o al menos aproximadamente el 65 %, o al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 85 %, o al menos aproximadamente el 90 %, o idéntica en al menos aproximadamente el 95 % idéntica, o idéntica en al menos aproximadamente el 95 %, o idéntica en al menos aproximadamente el 96 %, o idéntica en al menos aproximadamente el 97 %, o idéntica en al menos aproximadamente el 98 %, o idéntica en al menos aproximadamente el 99 % (o cualquier porcentaje de identidad de entre el 45 % y el 99 %, en aumentos de números enteros), a la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia. En una realización, el homólogo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que es idéntica en menos del 100 %, idéntica en menos de aproximadamente el 99 %, idéntica en menos de aproximadamente el 98 %, idéntica en menos de aproximadamente el 97 %, idéntica en menos de aproximadamente el 96 %, idéntica en menos de aproximadamente el 95 % y así sucesivamente, en incrementos del 1 %, idéntica en menos de aproximadamente el 70 % a la secuencia de aminoácidos de origen natural de la proteína de referencia.
- Como se usa en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, la referencia a un porcentaje (%) de identidad se refiere a una evaluación de homología que se realiza usando: (1) una búsqueda de homología BLAST 2.0 Basic BLAST usando blastp para las búsquedas de aminoácidos y blastn para las búsquedas de ácidos nucleicos con parámetros por defecto convencionales, en la que la secuencia de consulta se filtra para determinar regiones de baja complejidad por defecto (descrita en Altschul, S.F., Madden, T.L., Schääffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997) "*Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*". *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402); (2) una alineación BLAST 2 (usando los parámetros que se describen a continuación); (3) y/o PSIBLAST con los parámetros convencionales por defecto (BLAST iterada específica de posición. Se señala que debido a algunas diferencias en los parámetros convencionales entre BLAST 2.0 Basic BLAST y BLAST 2, puede reconocerse que dos secuencias específicas tienen homología significativa usando el programa BLAST 2, mientras que una búsqueda realizada en BLAST 2.0 Basic BLAST usando una de las secuencias ya que la secuencia de consulta puede no identificar la segunda secuencia en los mejores apareamientos. Además, PSI-BLAST proporciona un sistema automatizado, versión fácil de usar de una búsqueda "perfil", que es una forma sensata de buscar homólogos de secuencia. El programa primero realiza una búsqueda en la base de datos BLAST con huecos. El programa PSI-BLAST usa la información de cualquier alineación significativa devuelta para construir una matriz de puntuación específica de posición, que sustituye la secuencia de consulta para la siguiente ronda de consulta de base de datos. Por tanto, ha de entenderse que el porcentaje de identidad puede determinarse mediante el uso de cualquiera de estos programas.
- Pueden alinearse dos secuencias específicas entre sí usando la secuencia BLAST 2 como se describe en Tatusova y Madden, (1999), "*Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences*", *FEMS Microbiol Lett.* 174: 247-250. La alineación de secuencias de BLAST 2 se realiza en blastp o blastn usando el algoritmo BLAST 2.0 para realizar una búsqueda BLAST con huecos (BLAST 2.0) entre las dos secuencias que permiten la introducción de huecos (deleciones e inserciones) en la alineación resultante. Con fines de claridad en el presente documento, se realiza una alineación de secuencias de BLAST 2 usando los parámetros convencionales por defecto como se indica a continuación.

Para blastn, usando la matriz 0 BLOSUM62:

- Recompensa por apareamiento = 1
- Penalización por despareamiento = -2
- 5 Penalizaciones de hueco abierto (5) y ampliación de hueco (2)
- x_disminución de hueco (50) esperado (10) tamaño de palabra (11) filtro (on)

Para blastp, usando matriz 0 BLOSUM62:

- 10 Penalizaciones de hueco abierto (11) y ampliación de hueco (1)
- x_disminución de hueco (50) esperado (10) tamaño de palabra (3) filtro (on).

15 Como se usa en el presente documento, un "agonista" es cualquier compuesto o agente, incluyendo sin limitación moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, anticuerpos, agentes de unión a ácidos nucleicos, etc., que se une a un receptor o ligando o interactúa con otra molécula o dentro de un producto químico o sistema biológico y produce o desencadena una respuesta, que puede incluir agentes que imitan la acción de una sustancia de origen natural (por ejemplo, un agonista de una proteína o péptido). Un "antagonista" es cualquier compuesto o agente, incluyendo sin limitación moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, anticuerpos, agentes de unión a ácidos nucleicos, etc., que bloquea o inhibe o reduce la acción de un agonista o una sustancia de origen natural.

20 Una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su medio natural (es decir, que ha sido objeto de manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o cromosoma en el que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Como tal, "aislada" no refleja necesariamente el grado en que la molécula de ácido nucleico se ha purificado, sino que indica que la molécula no incluye un genoma entero o un cromosoma completo en el que la molécula de ácido nucleico se encuentra en la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir un gen. Una molécula de ácido nucleico aislada que incluye un gen no es un fragmento de un cromosoma que incluye dicho gen, sino que incluye la región codificante y regiones reguladoras asociadas al gen, pero no hay genes adicionales que se encuentren naturalmente en el mismo cromosoma. Una molécula de ácido nucleico aislada también puede incluir una secuencia de ácido nucleico especificada flanqueada por (es decir, en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la secuencia) ácidos nucleicos adicionales que normalmente no flanquean la secuencia de ácido nucleico especificada en la naturaleza (es decir, secuencias heterólogas). La molécula de ácido nucleico aislada puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm) o derivados ya sea de ADN o ARN (por ejemplo, ADNc). Aunque la frase "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula de ácido nucleico física y la frase "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos frases pueden usarse indistintamente, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico, siendo capaz de codificar una proteína o dominio de una proteína. El término "polinucleótido" también puede usarse de manera intercambiable con los términos "molécula de ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico".

40 Una molécula de ácido nucleico recombinante es una molécula que puede incluir al menos una de cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique una cualquiera o más proteínas descritas en el presente documento unidas operativamente a al menos una de cualquier secuencia de control de la transcripción capaz de regular eficazmente la expresión de la molécula o moléculas de ácido nucleico en la célula que se ha de transfectar. Aunque la frase "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula de ácido nucleico física y la frase "secuencia de ácido nucleico" se refiere principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las dos frases pueden usarse indistintamente, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico, siendo capaz de codificar una proteína. Además, la frase "molécula recombinante" se refiere principalmente a una molécula de ácido nucleico unida operativamente a una secuencia control de la transcripción, pero puede usarse de forma intercambiable con la frase "molécula de ácido nucleico" que se administra a un animal.

55 Una molécula de ácido nucleico recombinante incluye un vector recombinante, que es cualquier secuencia de ácido nucleico, normalmente una secuencia heteróloga, que está unida operativamente a la molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de fusión de la presente invención, que es capaz de permitir la producción recombinante de la proteína de fusión y que es capaz de entregar la molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora de acuerdo con la presente invención. Dicho vector puede contener secuencias de ácido nucleico que naturalmente no se encuentran adyacentes a las moléculas de ácido nucleico aisladas que se han de insertar en el vector. El vector puede ser ARN o ADN, ya sea procaríota o eucariota y, preferentemente en la presente invención, es un virus o un plásmido. Los vectores recombinantes pueden usarse en la clonación, secuenciación y/o manipulación de otra manera de moléculas de ácido nucleico y pueden usarse en la entrega de dichas moléculas (por ejemplo, como en una composición de ADN o una composición a base de vector vírico). Los vectores recombinantes se usan preferentemente en la expresión de moléculas de ácido nucleico y también pueden denominarse vectores de expresión. Los vectores recombinantes preferidos son capaces de expresarse en una célula hospedadora transfectada.

65

En una molécula recombinante de la presente divulgación las moléculas de ácido nucleico se unen operativamente a vectores de expresión que contienen secuencias reguladoras tales como secuencias de control de la transcripción, secuencias de control de la traducción, orígenes de replicación y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula hospedadora y que controlan de la expresión de moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

5 En particular, las moléculas recombinantes de la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico que se unen operativamente a una o más secuencias de control de expresión. La frase "operativamente unida" se refiere a la unión de una molécula de ácido nucleico a una secuencia de control de la expresión de una forma de manera que la molécula se exprese cuando se transfecta (es decir, se transforma, se transduce o se transfecta) en una célula hospedadora.

10 De acuerdo con la presente divulgación el término "transfección" se usa para referirse a cualquier método por el cual una molécula de ácido nucleico exógeno (es decir, una molécula de ácido nucleico recombinante) puede insertarse en una célula. El término "transformación" puede usarse indistintamente con el término "transfección" cuando dicho término se usa para referirse a la introducción de moléculas de ácido nucleico en células microbianas, tales como algas, bacterias y levaduras. En los sistemas microbianos, el término "transformación" se usa para describir un cambio heredado debido a la obtención de ácidos nucleicos exógenos por el microorganismo y es esencialmente sinónimo del término "transfección". Por tanto, las técnicas de transfección incluyen, pero no se limitan a, transformación, tratamiento químico de las células, bombardeo de partículas, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, infección y fusión de protoplastos.

15 Los siguientes resultados experimentales se proporcionan con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

25 Ejemplos

Los siguientes materiales y métodos se usaron en los Ejemplos a continuación.

Ratones y estirpes celulares tumorales

30 Para la estimulación *in vitro* de linfocitos, se obtuvieron ratones C57BL/6 (H-2b) hembra del Instituto Nacional contra el Cáncer de los EE.UU., Instalación de Investigación y Desarrollo contra el Cáncer Frederick (Frederick, MD). Una pareja de cría de ratones C57BL/6 homocigotos para la expresión del gen de CEA humano (CEA-Tg) fue proporcionada generosamente por el Dr. John Shively (City of Hope, Duarte, CA). La homocigosidad para la expresión de CEA se confirmó mediante análisis por PCR de ADN de cola de ratón (Greiner et al., *Cancer Res*, 1 de diciembre de 2002; 62 (23): 6944-51). Se usaron ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad para todos los experimentos y se alojaron en jaulas micro-aislantes en condiciones libres de patógenos de acuerdo con las directrices de la AAALAC. Se realizaron estudios experimentales con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales Intramural del INS de los EE.UU. La estirpe celular de tumor diana EL-4 (H-2b, timoma) se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células tumorales de adenocarcinoma de pulmón murino LL/2 6 fueron el regalo del Dr. Chandan Guha (Albert Einstein College of Medicine, Nueva York, NY). Se generaron células de carcinoma de pulmón murino LL/2 que expresan CEA humano (LL2-CEA) por transducción retroviral con ADNc de CEA, como se ha descrito anteriormente (Robbins et al., *Cancer Res*, 15 de julio de 1991; 51 (14): 3657-62). Las células se mantuvieron en medio completo (DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomina 100 µg/ml).

45 Construcciones de vacuna

Se han descrito anteriormente virus variolovacunal recombinante (rV) y virus de la viruela aviar recombinante (rF) que contienen genes murinos B7-1, ICAM-1 y LFA-3, así como el gen de CEA humano (rV/F-CEA/TRICOM) (Hodge et al., *Cancer Res*, 15 de noviembre de 1999; 59 (22): 5800-7; y Grosenbach et al., *Cancer Res*, 1 de junio de 2001; 61 (11): 4497-505). El virus rF que expresa GM-CSF murino (rFGM-CSF) se ha descrito anteriormente (Kass et al., *Cancer Res*, 1 de enero de 2001; 61 (1): 206-14). Una construcción de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que expresa la proteína CEA de longitud completa (levadura-CEA) se ha descrito anteriormente (Bernstein et al., *Vaccine*, 24 de enero de 2008; 26 (4): 509-21). Se produjo levadura-CEA y se inactivó por calor para estos estudios como se ha descrito anteriormente (Haller et al., *Vaccine*, 9 de febrero de 2007; 25 (8): 1452-1463).

Esquemas de vacunación

60 Para el análisis de citocinas séricas, se vacunaron ratones CEA-Tg (n = 2) con 1×10^8 ufp de rVCEA/TRICOM o 4 UL/animal (1 UL = 10^7 partículas de levadura) de levadura-CEA como se ha descrito anteriormente (Wansley et al., *Clin Cancer Res*, 1 de julio de 2008; 14 (13): 4316-25). Para todos los otros estudios, el grupo de la vacuna de rV/F-CEA/TRICOM, los ratones CEA-Tg se sensibilizaron con 1×10^8 ufp de rV-CEA/TRICOM mezclado con 1×10^7 ufp de rF-GM-CSF el día 0 y se reforzaron cada 7 días con 1×10^8 ufp de rF-CEA/TRICOM mezclado con 1×10^7 ufp de rF-GM-CSF. Para el resto de los Ejemplos y en otras partes de acuerdo con la presente invención, este protocolo de vacunas se designa en general como "rV/F-CEA/TRICOM". En el grupo de la vacuna de levadura-CEA, se vacunaron ratones CEA-Tg cada 7 días con levadura-CEA (4 UL/ratón). Los ratones que recibieron la combinación

de vacunas de rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA se sensibilizaron con 1×10^8 ufp de rV-CEA/TRICOM, administrado por vía subcutánea en el flanco derecho dorsal y con 4 UL/ratón de levadura-CEA, entregado por vía subcutánea en la parte interna de las piernas y los omóplatos. La separación de la dosis de levadura-CEA a través de múltiples sitios se ha descrito anteriormente (Wansley, 2008, citado anteriormente) y se ha empleado en el presente documento para separar no solo la vacuna de levadura-CEA, sino también la rV/F-CEA/TRICOM para dirigir a múltiples ganglios linfáticos de drenaje en el ratón. Se reforzaron ratones en el grupo de combinación a intervalos de 1 semana durante el resto del estudio con 1×10^8 ufp de rF-CEA/TRICOM y levadura-CEA (4 UL/ratón).

Perfiles de expresión de citocinas

Para el análisis de citocinas séricas, se extrajo sangre de ratones vacunados (véase el esquema de vacunación anterior) los días 0, 2, y 4 después de la vacunación y se aisló el suero. La expresión de citocinas se analizó usando un panel de Th1/Th2 y citocinas proinflamatorias de Linco Diagnostic Services (St. Charles, MO). Para medir las citocinas secretadas por linfocitos T CD8+ de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA (n = 5), se cultivaron en volumen linfocitos T CD8+ y se volvieron a estimular en presencia de péptido CEA-572-579 (GIQNSVSA, designado CEA-572 y representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 11) o péptido CEA-526-533 (EAQNTTYL, designado CEA-526 y representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 12) (10 µg/ml) como se ha descrito anteriormente (Wansley et al., 2008, citado anteriormente). Los niveles de citocinas se midieron usando el kit de matriz de perlas citométricas de citocinas inflamatorias de ratón y el kit de matriz de perlas citométricas de citocinas Th1/Th2 de ratón (BD Biosciences, San Jose, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Perfiles del receptor de linfocitos T (TCR)

Se aisló ARN usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después se usó el ARN en reacciones de PCR-TI usando el Sistema de Síntesis de Primera Cadena Superscript® de Invitrogen para PCR-TI (Invitrogen, 8 Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se amplificaron genes Vα y Vβ usando los cebadores y las condiciones descritos anteriormente para los genes 19 Vα y 24 Vβ (Pannetier et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1 de mayo de 1993; 90 (9): 4319-23; Arden et al., *Nature*, 29 de agosto-4 de septiembre de 1985; 316 (6031): 783-7). Los productos de PCR se analizaron usando el Bioanalizador Agilent 2100 y Kit de reactivo Agilent DNA 1000 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) mediante electroforesis OnChip de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó el software Agilent 2100 Expert (versión B.02.06SI418 [versión 01]) para identificar los productos de PCR por tamaño (pb) y cantidad (nmol/l). Para cada muestra, se sumaron cantidades de cada gen presente y se calculó, para cada gen, un porcentaje repertorio Vα o Vβ de TCR total.

Un panel de selección de TCR Vβ de ratón (BD Pharmingen, San Jose, CA) que consiste en anticuerpos monoclonales específicos para ratón Vβ de TCR 2, 3, 4, 5.1 y.2, 6, 7, 8.1 y 8.2, 8.3, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 17 se usaron para identificar la expresión de Vβ de TCR a nivel de proteínas por citometría de flujo usando un citómetro FACScan (Becton Dickinson).

Oligomatriz de ADNc

Se dejaron sin tratar o se vacunaron ratones CEA-Tg 3 veces a intervalos de 1 semana con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA. En el día 33, se recogieron esplenocitos y se aisló ARN. Se usaron la activación de linfocitos T y células B, quimiocinas y receptores de quimiocinas y oligomatrices de ADNc de citocinas comunes (SABiosciences, Frederick, MD) para investigar cambios en la expresión génica. Los genes se consideraron regulados positivamente o regulados negativamente si su relación de intensidad normalizada fue >2 o <0,5 (un punto de corte de 2 veces), respectivamente, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Estirpes celulares de CTL específicas de CEA y ensayos in vitro

Se mantuvieron estirpes de linfocitos T específicos de CEA-526 y específicos de CEA-572 generadas a partir de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA en cultivo con péptido CEA-526 o CEA-572 (1 µg/ml) e IL-2 (10 U/ml) con CPA irradiadas recién preparadas. Para medir la capacidad de las estirpes de linfocitos T para lisar objetivos marcados con ^{111}In , se incubaron diversas relaciones de linfocitos T con dianas marcadas por triplicado a 37 °C y 5 % de CO₂ en placas de 96 pocillos de fondo en U. En ciertos estudios, se usó anticuerpo de bloqueo anti-CMH de clase I (H2D^b, BD Pharmingen) para distinguir entre citotoxicidades mediadas por TCR y similares a NK. La radiactividad en los sobrenadantes se midió usando un contador gamma (Corba Autogamma, Packard Instruments, Downers Grove, IL). El porcentaje de lisis tumoral se calculó como se indica a continuación: % de lisis tumoral = [(cpm experimental - cpm espontáneo)/(cpm máximo - cpm espontáneo)] x 100. Para evaluar la avidéz de estirpes de CTL específicas de CEA, se sometió a ensayo la actividad de destrucción tumoral como se ha descrito anteriormente (Hodge et al., 2005, *J Immunol* 174 (10): 5994-6004). Los datos se promediaron y se representaron como Δ de % de lisis específica. Para normalizar grupos dentro de cada experimento, los datos también se expresaron como porcentaje de lisis máxima frente a concentración de péptido. Por último, el logaritmo natural de los datos normalizados se representó frente a la concentración de péptido. La avidéz de cada población

de linfocitos T se definió como el logaritmo negativo de la concentración de péptido que dio como resultado el 50 % de la lisis diana máxima (Hodge et al., 2005, citado anteriormente y Derby et al., 2001, *J Immunol* 166 (3): 1690-1697) y se expresó en nM. El péptido HIV-gag-390-398 (SQVTNPANI, designado péptido HIV-gag y representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 13 se utilizó como control negativo en el presente experimento. Se obtuvieron tetrámeros de péptido de CMH de clase I específicos para CEA-526 y CEA-572 de Beckman Coulter (Fullerton, CA). Cuando se indica, la actividad de CTL se convirtió en unidades líticas (UL), como se describe por Wunderlich et al. (1994, "Induction and measurement of cytotoxic T lymphocyte activity" en: Coligan J, Kruisbeek A, Margulies D, Shevach E, Strober W (editores) *Current Protocols in Immunology*, Wiley, Hoboken, NJ).

10 Estudios de terapia tumoral

Para los estudios de terapia que implican tumores de LL2-CEA, se inyectaron ratones CEA-Tg hembra de 6 a 8 semanas de edad por vía i.v. en la cola con 3×10^5 células LL2-CEA en un volumen de 100 μ l. Cuatro días después de la implantación del tumor, los ratones se sensibilizaron y después se reforzaron como se ha descrito anteriormente. Para enumerar las metástasis pulmonares, se inflaron pulmones de ratones sacrificados, teñidos con tinta china y se fijaron en solución de Fekete (Wexler, *J Natl Cancer Inst*, abril de 1966; 36 (4): 641-5).

Análisis estadístico

20 Se usó GraphPad Prism versión 4.0a para Macintosh (GraphPad Software, San Diego, CA) para realizar el análisis estadístico sobre datos *in vivo*. Se realizó un ensayo de Mann-Whitney no paramétrico, de 2 colas, para determinar el número promedio de tumores por ratón el día 45. Se realizó un ensayo de log-rango (Mantel-Cox) para ratones que portan > 10 nódulos tumorales pulmonares el día 45 que se consideró que tenían ≤ 1 semana de vida. Todos los valores se calcularon en un intervalo de confianza del 95 % y un valor de $p \leq 0,05$ se consideró significativo.

25

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo muestra el papel del vector inmunoterápico en la inducción de respuestas inmunitarias innatas del hospedador de citocinas y quimiocinas, que puede influir posteriormente en las respuestas de linfocitos T específicos de CEA.

30

En el presente experimento, se investigó el papel del vector inmunoterápico en la inducción de respuestas inmunitarias innatas del hospedador de citocinas y quimiocinas, que puede influir posteriormente en las respuestas de linfocitos T específicos de CEA. Brevemente, se vacunaron ratones CEA-Tg ($n = 2$) con rV-CEA/TRICOM o levadura-CEA. Se recogió suero los días 0, 2 y 4, se agrupó y se analizó para un panel de citocinas usando un panel de Th1/Th2 y citocinas proinflamatorias. Como se muestra en la Figura 1, rV-CEA/TRICOM (cuadrados cerrados) induce un perfil de citocinas de tipo Th1, donde los niveles de MIP1 α , RANTES, GM-CSF e IL-12p70 son altos y los niveles de IL-5 son bajos (Figuras 1A, B, C y E, respectivamente). Por el contrario, la vacunación con levadura-CEA induce un perfil de citocinas Th1/Th2 mixto con niveles aumentados de IL-6 (Figura 1D), niveles bajos de MIP1 α , RANTES, IL-13, e IL-5 (Figuras 1A, B, F e I, respectivamente). Los datos se presentan como pg/ml de citocina en cada día. Estos datos muestran que la vacunación con rVCEA/TRICOM frente a levadura-CEA induce la expresión de diferentes citocinas, lo que indica que cada una de las plataformas de vacunas induce diferentes poblaciones de linfocitos T.

35

40

45 Ejemplo 2

El siguiente ejemplo demuestra que la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM frente a levadura-CEA induce distintos repertorios de TCR.

50 Este experimento buscaba determinar si la vacunación con cualquiera de las plataformas induce poblaciones de linfocitos T CD8+ con distintos repertorios de TCR. Se vacunaron ratones CEA-Tg ($n = 5$ por grupo) con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA como se ha descrito en la sección Materiales y métodos anteriormente. Los ratones sin tratar sirvieron como control negativo (Figuras 2A y 2D). Se recogieron bazo de ratones vacunados 14 días después de la vacunación y se agruparon. Se realizaron reacciones de PCR-TI usando cebadores específicos de 19 V α y específicos de 24 V β . Los productos de PCR después se analizaron y se calculó el porcentaje del repertorio de TCR total para cada gen (Figura 2; los asteriscos indican genes que se expresan únicamente en los linfocitos T de ratones vacunados con una vacuna en comparación con la otra). Los perfiles de TCR V α de esplenocitos de ratones sin tratar y ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA indican que cada grupo tiene un perfil de expresión de TCR V α distinto (Figuras 2A a C). La expresión de 12 de los 19 genes V α fue similar entre linfocitos T inducidos por ambas vacunas, mientras que 7 genes V α son únicos para poblaciones de linfocitos T de una vacuna en comparación con la otra (Figuras 2B y C). La comparación de los repertorios V β de estos mismos animales indicó que, con unas pocas excepciones, los perfiles de V β también difieren entre los dos grupos de ratones (Figuras 2D a E). La expresión de 14 de los 24 genes V β fue similar entre los linfocitos T inducidos por ambas vacunas, sin embargo, las vacunas inducen genes V β únicos también. Como se muestra en las Figuras 2E y F, se expresaron 10 genes V β de forma única por linfocitos T de ratones CEA-Tg vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA (V β 1, V β 4, V β 5.1, V β 5.2, V β 5.3, V β 8.1, V β 8.3, V β 9, V β 10 y V β 20). Estos datos indican que los repertorios de TCR

65

V α y V β de linfocitos T de ratones sin tratar y ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA tienen los dos patrones compartidos y únicos de expresión del gen TCR. Se desconoce, sin embargo, si estas diferencias se deben a un procesamiento y una presentación diferentes del antígeno CEA por las diferentes células infectadas por vectores o a los propios vectores. Los repertorios de TCR de estirpes de linfocitos T específicos para dos epítomos de CEA diferentes creados a partir de ratones CEA-Tg vacunados con las dos plataformas de vectores se describen en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 3

El siguiente ejemplo muestra que la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA induce tanto la expresión de genes tanto compartidos como únicos en respuesta al vector y el antígeno.

Para investigar los efectos tanto del vector como del antígeno sobre la expresión génica de esplenocitos, se usaron oligomatrices de ADNc para caracterizar adicionalmente las poblaciones de linfocitos T inducidas por vacunación con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA. Se investigó la expresión de 252 genes implicados en la activación de linfocitos T y células B, quimiocinas, receptores de quimiocinas y citocinas por esplenocitos de ratones CEA-Tg vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA. La Tabla 1 muestra que, para cada matriz, tanto rV/F-CEA/TRICOM como levadura-CEA inducen cambios en la expresión de los mismos genes, incluyendo la regulación positiva de 26 genes en al menos 2 veces, la mayoría de los cuales están implicados en la señalización de citocinas. Además, ambas vacunas regulan positivamente Ltb4r2, un receptor de leucotrienos involucrado en la quimiotaxis de células inmunitarias, genes implicados en la proliferación de linfocitos T, tales como fosfoproteína-1 secretada (Spp1 u osteopontina) y el supresor tumoral Inha. Al mismo tiempo, cada plataforma de vacuna induce cambios únicos en la expresión de varios genes (Tabla 1, negrita). Levadura-CEA regula negativamente genes implicados en la quimiotaxis de células inmunitarias tales como Cc112, Cxcl9, Ccr9, mientras que rV/F-CEA/TRICOM no altera la expresión de ninguno de estos genes. Los resultados del presente experimento indican que las dos plataformas de vacunas inducen cambios en la expresión génica que son tanto compartidos como únicos.

Tabla 1

Vacunación	Genes implicados en la activación de linfocitos T y células B	Quimiocinas y receptores de quimiocinas	Citocinas
rV/F-CEA/TRICOM/ Sin tratamiento			
Genes regulados positivamente >2 veces	H60, Igfbp1b, Il11, Il4	Inha (3.03), Ltb4r2, Bmp10, Bmp5	Il17c, Il17f, Inhba Fgf10, Gdf2, Gdf5, Gdf8, Ifna2, Ifna4, Ifnbl, 1113, Il17b, Il25, Il19, Ilf10, Ilf5, Ilf6, Ilf8, Il20, Il3, Il9
Genes regulados negativamente >2 veces	Ms4al, Sppl (4.00)		Il1rn (4.29)
Levadura-CEA/ Sin tratamiento			
Genes regulados positivamente >2 veces	Rag1 (3.48) H60 (3.25), Igfbp1b (3.25), Il11 (3.25), Il4	Bdnf, Ccl20, Cmtn2a, Cmtn5, Cxcl15, Gdf5, Ccl17 Inha (4.92), Ltb4r2 (4.92), Bmp10, Bmp5	GdX Fgf10, Gdf2, Gdf5, Gdf8, Ifna2, Ifna4, Ifnbl, Il13, Il17b, Il25, Il19, Ilf10, Ilf5, Ilf6, Ilf8, Il20, Il3, Il9
Genes regulados negativamente >2 veces	Tnfrsf13c (6.06) Ms4al (3.25), Spp1	Ccl12 (3.03), Cc18 (3.73) Ccr9, Ccr2, Csf2, Cx3crl, Cxcl10, Cxcl13, Hif1a, Inhbb, Lif (3.48), Gusb, Cxcl9 (4.92)	Gdf3(4.0), 1110, Csf-2, FasI, Tnf, Tnfrsf11b, Tnfsf15
Los genes en negrita se regulan positivamente/negativamente específicamente por esplenocitos de ratones vacunados ya sea con rV/F-CEA/TRICOM o con levadura-CEA, pero no por ambos. Los cambios en número de veces >3 veces se indican entre paréntesis			

Ejemplo 4

El siguiente ejemplo demuestra que rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA inducen poblaciones de linfocitos T funcionalmente distintas.

Para determinar la respuesta específica de antígeno de poblaciones de linfocitos T inducidas por las vacunas, se investigaron las citocinas producidas por los linfocitos T de animales vacunados después de la estimulación *in vitro* con cualquiera de dos epítomos de CEA individuales (CEA-572 y CEA-526). La Figura 3A ilustra proteína CEA que muestra los epítomos CEA-526 y CEA-572 discretos, no solapados, en el bucle A3 del dominio III.

Haciendo referencia a la Figura 3, se sensibilizaron ratones CEA-Tg (n = 5) con rV-CEA/TRICOM (barras continuas) el día 0 y se reforzaron los días 7 y 14 con rFCEA/TRICOM; se sensibilizaron ratones CEA-Tg (n = 5) el día 0 y se reforzaron los días 7 y 14 con levadura-CEA (barras abiertas). En el día 33, los ratones se sacrificaron y los bazo se agruparon y se pusieron en cultivos en volumen ya sea con péptido CEA-526 (Figura 3B) o CEA-572 (Figura 3C) durante 7 días. Se midieron IL-2, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-5 e IL-4 mediante matriz de perlas de citocinas (pg/ml/l x 10⁶ células) después de linfocitos se volvieron a estimular durante 24 horas con péptido específico de CEA o control de péptido VSVN. Todos los datos se han normalizado con el control de péptido VSVN.

Se observó que los dos epítomos de CEA diferentes inducen diferentes niveles de producción de citocinas a partir de linfocitos T de animales vacunados. Se secretan niveles mayores de TNF- α en respuesta a CEA-526 después de la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM en comparación con levadura-CEA (Figura 3B, barra cerrada), sin embargo, la vacunación con levadura-CEA produce niveles significativamente más altos de TNF- α cuando los linfocitos T se estimulan con el péptido CEA-572 (Figura 3C, barra abierta). Además, los linfocitos T de la vacunación con levadura-CEA inducen niveles más altos de IL-2 en comparación con los linfocitos T de la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM, cuando se estimulan con los péptidos CEA526 y CEA-572 (Figuras 3B y 3C, barras abiertas). De forma similar, después de la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM, los linfocitos T inducen niveles más altos de IFN- γ en comparación con la vacunación con levadura-CEA en respuesta a los péptidos CEA-526 y CEA-572 (Figuras 3B y 3C, barras cerradas).

Los datos también muestran que los linfocitos T de animales vacunados secretan diferentes niveles de diversas citocinas en respuesta a un único epítomo de CEA. Los linfocitos T de ratones vacunados con levadura-CEA secretan IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-5 e IL-2 en respuesta al epítomo de CEA-572 (Figura 3C, barras abiertas). Por otro lado, los linfocitos T de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM secretan niveles significativamente más altos de IFN- γ en comparación con levadura-CEA en respuesta al péptido CEA-572 y niveles menores de IL-10 y TNF- α en respuesta al epítomo de CEA-572 (Figura 3C, barras cerradas). Estos resultados indican que las poblaciones de linfocitos T inducidas por vacunación con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA son específicas de antígeno y funcionalmente distintas.

Ejemplo 5

El siguiente ejemplo demuestra que las estirpes de linfocitos T desarrolladas a partir de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM frente a levadura-CEA tienen 14 repertorios de TCR distintos y avides funcional.

Para explorar adicionalmente diferencias potenciales en la funcionalidad de los linfocitos T de ratones vacunados ya sea con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA, se crearon estirpes de linfocitos T específicas para cualquiera de péptido CEA-526 o CEA-572 a partir de ratones CEA-Tg vacunados como se describe en los Materiales y Métodos. Brevemente, ratones CEA-Tg (n = 5 por grupo) vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA como se ha descrito anteriormente. Dos semanas después de la vacunación final, se recogieron bazo y se agruparon y los esplenocitos se cultivaron en volumen con péptido CEA-526 o CEA-572 durante 7 días. Los linfocitos se volvieron a estimular con el péptido fresco, IL-2 y se CPA irradiadas cada 7 días y se mantuvieron en cultivo para experimentos *in vitro*. Se realizó un análisis de perfil de TCR después de 18 ciclos de estimulación.

Los perfiles V α de TCR de las estirpes celulares 4 indican que las poblaciones de linfocitos T tienen repertorios de TCR de V α compartidos y únicos. Haciendo referencia a la Figura 4, se muestran repertorios de TCR de V α de estirpes de linfocitos T rV/F-CEA/TRICOM (barras de color negro) mantenidas en presencia de (Figura 4A) péptido CEA-526 y (Figura 4B) péptido CEA-572. La Figura 4 también muestra repertorios de TCR de V α de estirpes de linfocitos T levadura-CEA (barras de color blanco) mantenidos en presencia de (Figura 4C) péptido CEA-526 y (Figura 4D) péptido CEA572. Los resultados se expresan como porcentaje del repertorio total de TCR de cadena V α . Los asteriscos indican 31 genes que se expresan únicamente en linfocitos T de ratones vacunados con una vacuna en comparación con la otra.

En linfocitos T de ratones vacunados estimulados con el epítomo de CEA-526, los linfocitos T tienen una expresión compartida de 16 de los 19 genes V α y una expresión única de 3 genes V α (Figuras 4A y C). En linfocitos T de ratones vacunados estimulados con el epítomo de CEA-572, los linfocitos T tienen una expresión compartida de 15 de los 19 genes V α y una expresión única de 4 genes V α (Figuras 4B y D). Se observaron resultados similares cuando se analizaron los perfiles de TCR de V β (datos no mostrados). Además, se confirmó la expresión de genes de TCR de V β seleccionados entre las estirpes de linfocitos T por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado (datos no mostrados). Estos datos proporcionan evidencia adicional de que las poblaciones de linfocitos T de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM o levadura-CEA son ambos específicas de vector y de antígeno.

Para caracterizar las diferencias funcionales entre linfocitos T de cualquiera de los dos vectores, la actividad citolítica específica de CEA de los linfocitos T generadas a partir de rV/F-CEA/TRICOM se comparó con la generada a partir de la vacunación con levadura-CEA. La pureza de los cultivos de estirpes de linfocitos T se confirmó mediante tinción de la superficie celular con anticuerpos monoclonales para identificar células CD8, CD4 y NK, seguida de citometría de flujo (datos no mostrados). Además, la tinción del tetrámero usando tetrámeros de péptido de CMH de

clase I específicos para CEA-526 o CEA-572 confirmó la especificidad de péptido para las estirpes de linfocitos T (datos no mostrados).

5 Brevemente, se incubaron estirpes de linfocitos T generadas a partir de vacunación con rV/F-CEA/TRICOM y
 5 específicos para (Figura 5A) péptido CEA-526 y (Figura 5C) CEA-572 péptido con dianas célula EL-4 marcada con
 ^{111}In pulsado por péptido en las relaciones indicadas durante 4 h. También se incubaron estirpes de linfocitos T
 generadas a partir de vacunación con levadura-CEA y específicos para (Figura 5B) péptido CEA-526 y (Figura 5D)
 péptido CEA572 con dianas célula EL-4 marcada con ^{111}In en las relaciones indicadas durante 4 h. Haciendo
 referencia a la Figura 5, las células EL-4 marcadas con ^{111}In pulsadas con los péptidos CEA-572 y CEA-526 se
 10 representan mediante cuadrados continuos conectados por una línea continua, y las células EL-4 marcadas con
 ^{111}In pulsadas con VSVNP (control negativo) se representan mediante círculos abiertos conectados por una línea
 discontinua. Para determinar la avidéz de los linfocitos T, (Figura 5B, recuadro) se incubaron estirpes de linfocitos T
 específicos de CEA-526 de rV/F-CEA/TRICOM (cuadrados cerrados) y levadura-CEA (círculos abiertos) con de
 CEA-526 en presencia de diversas concentraciones de péptido CEA-526 (o control HIV-gag) que van de 1 μM a
 15 0 μM durante 4 h. También se usaron estirpes de linfocitos T específicos para el epítipo de CEA-572, generados a
 partir de ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM (Figura 5E) o levadura-CEA (Figura 5F), en ensayos de
 linfocitos T citolíticos con LL2-CEA marcados con ^{111}In y normalizados a LL2 (control negativo) en varias relaciones.
 Las barras indican el error típico de los pocillos por triplicado.

20 Las Figuras 5A y 5B muestran que una estirpe de linfocitos T específicos del péptido CEA-526 generada a partir de
 rV/F-CEA/TRICOM tiene una mayor actividad lítica en comparación con una estirpe de linfocitos T generada a partir
 de la vacunación con levadura-CEA. Las estirpes de linfocitos T específicas para el epítipo CEA-572 demostraron
 niveles similares de actividad citolítica (Figuras 5C y 5D). La Figura 5B muestra que la estirpe de linfocitos T
 específicos de CEA-526 generados a partir de la vacunación con rV/F-CEA/TRICOM tenía una avidéz 23,3 veces
 25 más alta que la estirpe de linfocitos T específicos para CEA-526 generados a partir de la vacunación con levadura-
 CEA.

Las estirpes de linfocitos T específicos de CEA-572 también se usaron en un ensayo de CTL dirigido a células LL2-
 CEA marcadas con ^{111}In . Se cultivaron linfocitos T específicos de CEA572 de ratones vacunados ya sea con rV/F-
 30 CEA/TRICOM o levadura-CEA durante 20 semanas antes de este ensayo. Ambas estirpes de linfocitos T lisan la
 diana LL2-CEA y la lisis disminuye a medida que la relación de los linfocitos T con respecto a las células efectoras
 (dianas LL2CEA) disminuye (Figuras 5E y 5F). Estos resultados indican que tanto las estirpes de linfocitos T son
 capaces de lisar células que expresan CEA, aunque la estirpe de linfocitos T de los ratones vacunados con
 levadura-CEA (Figura 5F) tuvieron un mayor nivel de actividad en comparación con la estirpe de linfocitos T de
 35 ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM (Figura 5E) cuando la lisis celular por LL2-CEA se normalizó a la de las
 células LL2.

Para confirmar que la lisis celular observada en las Figuras 5E y 5F estuvo mediada por TCR y no fue debido a la
 actividad de células NK, los experimentos de CTL con anticuerpos monoclonales de bloqueo específicos para
 40 moléculas de CMH de clase I se realizaron con las dianas tumorales LL2-CEA y se normalizaron a células diana LL2
 como control y mostraron que la presencia de anticuerpo de bloqueo del CMH de clase I anula la lisis celular. La
 falta de lisis mediada por células NK se confirmó adicionalmente en un CTL usando dianas YAK1, que descubrieron
 que la presencia de anticuerpo de bloqueo de clase CMH anuló la lisis celular de YAK1 por las diferentes estirpes de
 linfocitos T. Juntos, estos resultados indican que la actividad lítica de las estirpes de linfocitos T creadas a partir de
 45 diferentes vectores dirigidos al mismo epítipo de CEA está mediada por TCR y los niveles de lisis celular son
 similares a cuando se dirigen a células diana pulsadas con péptido, aunque su capacidad para lisar dianas
 tumorales que expresan CEA difiere. Adicionalmente, la avidéz de estirpes de linfocitos T inducidas por rV/F-
 CEA/TRICOM puede ser mayor que la de estirpes de linfocitos T creadas a partir de la vacunación con levadura-
 CEA. Estos resultados caracterizan adicionalmente las poblaciones de linfocitos T de ratones vacunados con rV-
 50 CEA/TRICOM o levadura-CEA como específicas de la plataforma.

Ejemplo 6

El siguiente ejemplo demuestra que la combinación de rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA es una terapia
 55 antitumoral eficaz en un modelo de metástasis pulmonar ortotópica murina.

Se realizaron estudios para determinar si la administración simultánea de las dos vacunas generaría una actividad
 antitumoral superior a la vacunación con cualquiera de las plataformas de vacunas solas. Brevemente, se inyectaron
 ratones CEA-Tg por vía i.v. con células tumorales LL2-CEA. En el día 4, los ratones se sensibilizaron con rV/F-
 60 CEA/TRICOM (n = 10), levadura-CEA (n = 14) o rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA (n = 10); un grupo de control (n
 = 17) no recibió ningún tratamiento. Los ratones se reforzaron cada 7 días durante la duración del experimento. El
 grupo de rV/F-CEA/TRICOM se reforzó con rV/F-CEA/TRICOM. El grupo de levadura-CEA se reforzó solo con la
 levadura-CEA. El grupo de combinación se reforzó con rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA. Para estos estudios, se
 inyectó rV/F-CEA/TRICOM por vía s.c. en el flanco derecho dorsal mientras que se entregó levadura-CEA 1 UL por
 65 vía s.c. en el interior de cada pierna y omóplato para dirigirse a múltiples ganglios linfáticos de drenaje. En el día 45,
 los ratones se sacrificaron y se recogieron, se tiñeron y se fijaron los pulmones. Los datos que se muestran en la

Figura 6 representan el número de metástasis pulmonares por ratón a partir de dos experimentos separados (indicados mediante símbolos abiertos frente a cerrados). La barra indica el número promedio de metástasis por ratón $p = 0,015$ comparando ratones sin tratar con el grupo de combinación de rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA.

5 Los ratones sin tratar tuvieron un promedio de 10,84 tumores por ratón (+2,41). Los ratones vacunados con rV/F-CEA/TRICOM tuvieron un promedio de 7,50 metástasis por ratón (+2,02) y los ratones vacunados con levadura-CEA tuvieron un promedio de 9,71 metástasis por ratón (+1,22). Sin embargo, los ratones vacunados con la combinación de rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA tuvieron 2,80 metástasis por ratón (+0,77); este grupo de combinación fue el único grupo con un número significativamente menor de metástasis en comparación con el control sin tratar ($p =$
 10 0,015). Además, el número máximo de metástasis por ratón para los grupos sin tratar, rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA fue de 36, 24 y 18, respectivamente, mientras que el número máximo de metástasis en el grupo de combinación fue de 7. Además, el ensayo de log-rango (ratones que portan >9 nódulos tumorales pulmonares el día 45; que se supone que tienen <1 semana de vida) mostró significación estadística entre ratones sin tratar y ratones que recibieron la combinación de rV/F-CEA/TRICOM y levadura CEA ($p = 0,0027$). Además, hubo significación estadística entre ratones tratados con rV/F-CEA/TRICOM solo frente a la vacunación simultánea con rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA ($p = 0,0293$). Además, no hubo significación estadística entre los ratones tratados con levadura-CEA sola frente a la vacunación simultánea con rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA ($p = 0,0017$). Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la administración simultánea de vacunas de rV/F-CEA/TRICOM y levadura-CEA puede aumentar la eficacia antitumoral.

20 Como se ha analizado anteriormente, los informes publicados que comparaban las plataformas de vacunas han llegado históricamente a la conclusión de que una es más eficaz que la otra en la estimulación del sistema inmunitario y, por tanto, han recomendado un desarrollo adicional de la plataforma más eficaz para los estudios clínicos (Riezebos-Brilman et al., *Gene Ther*, diciembre de 2007; 14 (24): 1695-704; y Casimiro et al., *J Virol*, junio
 25 de 2003; 77 (11): 6305-13). Los resultados proporcionados en el presente documento han demostrado que la población de linfocitos T inducida por cada plataforma presentó respuestas fenotípicas y funcionales, únicas y compartidas, a diferentes epítopos de CEA. Los resultados presentados en el presente documento muestran por primera vez que (a) las plataformas de 2 vacunas dirigidas al mismo antígeno inducen poblaciones de linfocitos T distintas, (b) la inducción de estas poblaciones de linfocitos T es tanto específica de vector y específica de antígeno y (c) las vacunas pueden usarse simultáneamente en un modelo antitumoral para mejorar la eficacia antitumoral.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> GlobelImmune, Inc.
United States of America, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services
Hodge, James
Schlom, Jeffrey
Franzussoff, Alex
- 40 <120> Composiciones inmunoterápicas de combinación y métodos
- <130> 3923-24-PCT
- <150> 61/170.530
- 45 <151> 17-04-2009
- <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1
<211> 2124
<212> ADN
<213> Artificial
- 55 <220>
<223> Construcción sintética
- 60 <220>
<221> CDS
<222> (7)..(2109)
- <400> 1

ES 2 660 597 T3

gaattc atg gag tct ccc tcg gcc cct ccc cac aga tgg tgc atc ccc	48
Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro	
1 5 10	
tgg cag agg ctc ctg ctc aca gcc tca ctt cta acc ttc tgg aac ccg	96
Trp Gln Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro	
15 20 25 30	
ccc acc act gcc aag ctc act att gaa tcc acg ccg ttc aat gtc gca	144
Pro Thr Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala	
35 40 45	
gag ggg aag gag gtg ctt cta ctt gtc cac aat ctg ccc cag cat ctt	192
Glu Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu	
50 55 60	
ttt ggc tac agc tgg tac aaa ggt gaa aga gtg gat ggc aac cgt caa	240
Phe Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln	
65 70 75	
att ata gga tat gta ata gga act caa caa gct acc cca ggg ccc gca	288
Ile Ile Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala	
80 85 90	
tac agt ggt cga gag ata ata tac ccc aat gca tcc ctg ctg atc cag	336
Tyr Ser Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln	
95 100 105 110	
aac atc atc cag aat gac aca gga ttc tac acc cta cac gtc ata aag	384

ES 2 660 597 T3

Asn	Ile	Ile	Gln	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	His	Val	Ile	Lys	
				115					120					125		
tca	gat	ctt	gtg	aat	gaa	gaa	gca	act	ggc	cag	ttc	cgg	gta	tac	ccg	432
Ser	Asp	Leu	Val	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Arg	Val	Tyr	Pro	
			130					135					140			
gag	ctg	ccc	aag	ccc	tcc	atc	tcc	agc	aac	aac	tcc	aaa	ccc	gtg	gag	480
Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Lys	Pro	Val	Glu	
			145				150					155				
gac	aag	gat	gct	gtg	gcc	ttc	acc	tgt	gaa	cct	gag	act	cag	gac	gca	528
Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asp	Ala	
	160					165					170					
acc	tac	ctg	tgg	tgg	gta	aac	aat	cag	agc	ctc	ccg	gtc	agt	ccc	agg	576
Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	
	175				180					185					190	
ctg	cag	ctg	tcc	aat	ggc	aac	agg	acc	ctc	act	cta	ttc	aat	gtc	aca	624
Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	
				195					200					205		
aga	aat	gac	aca	gca	agc	tac	aaa	tgt	gaa	acc	cag	aac	cca	gtg	agt	672
Arg	Asn	Asp	Thr	Ala	Ser	Tyr	Lys	Cys	Glu	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	
			210					215					220			
gcc	agg	cgc	agt	gat	tca	gtc	atc	ctg	aat	gtc	ctc	tat	ggc	ccg	gat	720
Ala	Arg	Arg	Ser	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	
		225					230					235				
gcc	ccc	acc	att	tcc	cct	cta	aac	aca	tct	tac	aga	tca	ggg	gaa	aat	768
Ala	Pro	Thr	Ile	Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Glu	Asn	
		240				245					250					
ctg	aac	ctc	tcc	tgc	cac	gca	gcc	tct	aac	cca	cct	gca	cag	tac	tct	816
Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	
	255				260					265					270	
tgg	ttt	gtc	aat	ggg	act	ttc	cag	caa	tcc	acc	caa	gag	ctc	ttt	atc	864
Trp	Phe	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	
				275					280					285		
ccc	aac	atc	act	gtg	aat	aat	agt	gga	tcc	tat	acg	tgc	caa	gcc	cat	912
Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	His	
			290					295					300			
aac	tca	gac	act	ggc	ctc	aat	agg	acc	aca	gtc	acg	acg	atc	aca	gtc	960
Asn	Ser	Asp	Thr	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Ile	Thr	Val	
		305					310					315				
tat	gag	cca	ccc	aaa	ccc	ttc	atc	acc	agc	aac	aac	tcc	aac	ccc	gtg	1008
Tyr	Glu	Pro	Pro	Lys	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	
		320				325						330				
gag	gat	gag	gat	gct	gta	gcc	tta	acc	tgt	gaa	cct	gag	att	cag	aac	1056
Glu	Asp	Glu	Asp	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Ile	Gln	Asn	
				340					345						350	
aca	acc	tac	ctg	tgg	tgg	gta	aat	aat	cag	agc	ctc	ccg	gtc	agt	ccc	1104
Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	
				355					360					365		

agg ctg cag ctg tcc aat gac aac agg acc ctc act cta ctc agt gtc 1152
 Arg Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val
 370 375 380

aca agg aat gat gta gga ccc tat gag tgt gga atc cag aac gaa tta 1200
 Thr Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu
 385 390 395

agt gtt gac cac agc gac cca gtc atc ctg aat gtc ctc tat ggc cca 1248
 Ser Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro
 400 405 410

gac gac ccc acc att tcc ccc tca tac acc tat tac cgt cca ggg gtg 1296
 Asp Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val
 415 420 425 430

aac ctc agc ctc tcc tgc cat gca gcc tct aac cca cct gca cag tat 1344
 Asn Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr
 435 440 445

tct tgg ctg att gat ggg aac atc cag caa cac aca caa gag ctc ttt 1392
 Ser Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe
 450 455 460

atc tcc aac atc act gag aag aac agc gga ctc tat acc tgc cag gcc 1440
 Ile Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala
 465 470 475

aat aac tca gcc agt ggc cac agc agg act aca gtc aag aca atc aca 1488
 Asn Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr
 480 485 490

gtc tct gcg gag ctg ccc aag ccc tcc atc tcc agc aac aac tcc aaa 1536
 Val Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys
 495 500 505 510

ccc gtg gag gac aag gat gct gtg gcc ttc acc tgt gaa cct gag gct 1584
 Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala
 515 520 525

cag aac aca acc tac ctg tgg tgg gta aat ggt cag agc ctc cca gtc 1632
 Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val
 530 535 540

agt ccc agg ctg cag ctg tcc aat ggc aac agg acc ctc act cta ttc 1680
 Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe
 545 550 555

aat gtc aca aga aat gac gca aga gcc tat gta tgt gga atc cag aac 1728
 Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn
 560 565 570

tca gtg agt gca aac cgc agt gac cca gtc acc ctg gat gtc ctc tat 1776
 Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr
 575 580 585 590

ggg ccg gac acc ccc atc att tcc ccc cca gac tog tct tac ctt tcg 1824
 Gly Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser
 595 600 605

gga gcg gac ctc aac ctc tcc tgc cac tcg gcc tct aac cca tcc ccg 1872
 Gly Ala Asp Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro
 610 615 620

ES 2 660 597 T3

cag tat tct tgg cgt atc aat ggg ata ccg cag caa cac aca caa gtt 1920
 Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val
 625 630 635

ctc ttt atc gcc aaa atc acg cca aat aat aac ggg acc tat gcc tgt 1968
 Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys
 640 645 650

ttt gtc tct aac ttg gct act ggc cgc aat aat tcc ata gtc aag agc 2016
 Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser
 655 660 665 670

atc aca gtc tct gca tct gga act tct cct ggt ctc tca gct ggg gcc 2064
 Ile Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala
 675 680 685

act gtc ggc atc atg att gga gtg ctg gtt ggg gtt gct ctg ata 2109
 Thr Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
 690 695 700

tagtttagcg gccgc 2124

<210> 2
 <211> 701
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 2

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
100 105 110

Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp

115		120		125
Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu	130	135		140
Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys	145	150		155
Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr		165		170
				175
Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln	180		185	190
Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn	195		200	205
Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg	210		215	220
Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro	225		230	235
				240
Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn		245		250
				255
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe		260		265
				270
Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn	275		280	285
Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser	290		295	300
Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Glu	305		310	315
				320
Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp		325		330
				335
Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr		340		345
				350
Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu	355		360	365

ES 2 660 597 T3

Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg
 370 375 380

Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser Val
 385 390 400

Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp
 405 410 415

Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu
 420 425 430

Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp
 435 440 445

Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser
 450 455 460

Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn
 465 470 475 480

Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser
 485 490 495

Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val
 500 505 510

Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn
 515 520 525

Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro
 530 535 540

Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val
 545 550 555 560

Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val
 565 570 575

Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro
 580 585 590

Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala
 595 600 605

Asp Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr
 610 615 620

ES 2 660 597 T3

Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe
 625 630 635 640

Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val
 645 650 655

Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr
 660 665 670

Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr Val
 675 680 685

Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
 690 695 700

5 <210> 3
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(534)

15 <400> 3

atg gtc ctc gac aca gca ggt ttg gag gag tac agt gca atg act gag	48
Met Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Thr Glu	
1 5 10 15	
tat aaa ctt gtg gtg gtt gga gct gtt ggc gta ggc aag agc gcc ttg	96
Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu	
20 25 30	
acg ata cag cta att cag aat cac ttt gtg gat gag tac gac cct acg	144
Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr	
35 40 45	
ata gag gac tcc tac agg aaa caa gta gta att gat gga gaa acc tgt	192
Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys	
50 55 60	
ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt cga gag gag tac agt gca atg	240
Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met	
65 70 75 80	
agg gac cag tac atg aga act ggg gag ggc ttt ctt tgt gta ttt gcc	288
Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala	
85 90 95	
ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat aga gaa caa	336
Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr Arg Glu Gln	
100 105 110	

ES 2 660 597 T3

att aaa aga gta aag gac tct gaa gat gtg cct atg gtc ctg gta ggg 384
 Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val Leu Val Gly
 115 120 125

aat aag tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac acg aaa cag gct cag 432
 Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys Gln Ala Gln
 130 135 140

gag tta gca agg agt tac ggg att ccg ttc att gag acc tca gca aag 480
 Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys
 145 150 155 160

aca aga cag ggt gtt gac gat gcc ttc tat aca tta gtc cga gaa att 528
 Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val Arg Glu Ile
 165 170 175

cga aaa tag 537
 Arg Lys

<210> 4
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

Met Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Thr Glu
1 5 10 15

Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
20 25 30

Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr
35 40 45

Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys
50 55 60

Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met
65 70 75 80

Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala
85 90 95

Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr Arg Glu Gln
100 105 110

Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val Leu Val Gly
115 120 125

Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys Gln Ala Gln
130 135 140

Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys
145 150 155 160

Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val Arg Glu Ile
165 170 175

Arg Lys

5 <210> 5
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(534)

15 <400> 5

ES 2 660 597 T3

atg gtc ctc gac aca gca ggt ttg gag gag tac agt gca atg act gag	48
Met Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Thr Glu	
1 5 10 15	
tat aaa ctt gtg gtg gtt gga gct tgt ggc gta ggc aag agc gcc ttg	96
Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu	
20 25 30	
acg ata cag cta att cag aat cac ttt gtg gat gag tac gac cct acg	144
Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr	
35 40 45	
ata gag gac tcc tac agg aaa caa gta gta att gat gga gaa acc tgt	192
Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys	
50 55 60	
ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt cga gag gag tac agt gca atg	240
Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met	
65 70 75 80	
agg gac cag tac atg aga act ggg gag ggc ttc ctt tgt gta ttt gcc	288
Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala	
85 90 95	
ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat aga gaa caa	336
Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr Arg Glu Gln	
100 105 110	
att aaa aga gta aag gac tct gaa gat gtg cct atg gtc ctg gta ggg	384
Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val Leu Val Gly	
115 120 125	
aat aag tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac acg aaa cag gct cag	432
Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys Gln Ala Gln	
130 135 140	
gag tta gca agg agt tac ggg att ccg ttc att gag acc tca gca aag	480
Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys	
145 150 155 160	
aca aga cag ggt gtt gac gat gcc ttc tat aca tta gtc cga gaa att	528
Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val Arg Glu Ile	
165 170 175	
cga aaa tag	537
Arg Lys	

<210> 6
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 6

Met Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Thr Glu
 1 5 10 15

Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
 20 25 30

Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr
 35 40 45

Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys
 50 55 60

Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met
 65 70 75 80

Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala
 85 90 95

Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr Arg Glu Gln
 100 105 110

Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val Leu Val Gly
 115 120 125

Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys Gln Ala Gln
 130 135 140

Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys
 145 150 155 160

Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val Arg Glu Ile
 165 170 175

Arg Lys

5 <210> 7
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(534)

15 <400> 7

ES 2 660 597 T3

atg gtc ctc gac aca gca ggt ttg gag gag tac agt gca atg act gag	48
Met Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Thr Glu	
1 5 10 15	
tat aaa ctt gtg gtg gtt gga gct gat ggc gta ggc aag agc gcc ttg	96
Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu	
20 25 30	
acg ata cag cta att cag aat cac ttt gtg gat gag tac gac cct acg	144
Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr	
35 40 45	
ata gag gac tcc tac agg aaa caa gta gta att gat gga gaa acc tgt	192
Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys	
50 55 60	
ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt cga gag gag tac agt gca atg	240
Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met	
65 70 75 80	
agg gac cag tac atg aga act ggg gag ggc ttt ctt tgt gta ttt gcc	288
Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala	
85 90 95	
ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat aga gaa caa	336
Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr Arg Glu Gln	
100 105 110	
att aaa aga gta aag gac tct gaa gat gtg cct atg gtc ctg gta ggg	384
Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val Leu Val Gly	
115 120 125	
aat aag tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac acg aaa cag gct cag	432
Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys Gln Ala Gln	
130 135 140	
gag tta gca agg agt tac ggg att ccg ttc att gag acc tca gca aag	480
Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys	
145 150 155 160	
aca aga cag ggt gtt gac gat gcc ttc tat aca tta gtc cga gaa att	528
Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val Arg Glu Ile	
165 170 175	
cga aaa tag	537
Arg Lys	

<210> 8
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 8

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

Arg Lys

5 <210> 9
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(534)

15 <400> 9

ES 2 660 597 T3

atg gtc ctc gac aca gca ggt ttg gag gag tac agt gca atg act gag	48
Met Val Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Thr Glu	
1 5 10 15	
tat aaa ctt gtg gtg gtt gga gct cgt ggc gta ggc aag agc gcc ttg	96
Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu	
20 25 30	
acg ata cag cta att cag aat cac ttt gtg gat gag tac gac cct acg	144
Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr	
35 40 45	
ata gag gac tcc tac agg aaa caa gta gta att gat gga gaa acc tgt	192
Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly Glu Thr Cys	
50 55 60	
ctc ttg gat att ctc gac aca gca ggt cac gag gag tac agt gca atg	240
Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly His Glu Glu Tyr Ser Ala Met	
65 70 75 80	
agg gac cag tac atg aga act ggg gag ggc ttt ctt tgt gta ttt gcc	288
Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys Val Phe Ala	
85 90 95	
ata aat aat act aaa tca ttt gaa gat att cac cat tat aga gaa caa	336
Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr Arg Glu Gln	
100 105 110	
att aaa aga gta aag gac tct gaa gat gtg cct atg gtc ctg gta ggg	384
Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val Leu Val Gly	
115 120 125	
aat aag tgt gat ttg cct tct aga aca gta gac acg aaa cag gct cag	432
Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys Gln Ala Gln	
130 135 140	
gag tta gca agg agt tac ggg att ccg ttc att gag acc tca gca aag	480
Glu Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys	
145 150 155 160	
aca aga cag ggt gtt gac gat gcc ttc tat aca tta gtc cga gaa att	528
Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val Arg Glu Ile	
165 170 175	
cga aaa tag	537
Arg Lys	

<210> 10
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 10

ES 2 660 597 T3

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

Arg Lys

<210> 11
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 10 <400> 11

Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser Ala
 1 5

15 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT

ES 2 660 597 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 12

Glu Ala Gln Asn Thr Thr Tyr Leu
1 5

10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 13

Ser Gln Val Thr Asn Pro Ala Asn Ile
1 5

20

<210> 14

<211> 2518

<212> ADN

25

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (494)..(1801)

30

<400> 14

tttgcttttg	cttatttccg	tccatttccc	tctctgcgcg	cggaccttcc	ttttccagat	60
ggtgagagcc	gcggggacac	ccgacgccgg	ggcaggctga	tccacgatcc	tgggtgtgcg	120
taacgccgcc	tggggctccg	tgggcgaggg	acgtgtgggg	acaggtgcac	cggaaactgc	180
cagactggag	agttgaggca	tccgaggcgc	gagaacagca	ctactactgc	ggcgagacga	240
gcgcggcgca	tcccaaagcc	cggccaaatg	cgctcgtccc	tgggagggga	gggagggcgcg	300

cctggagcgg ggacagtctt ggtccgcgcc ctectcccgg gtctgtgccg ggaccocggga 360

cccgggagcc gtcgcaggtc tcggccaag gggccccttt tctcggaagg gcggcggcca 420

agagcagggga aggtgatct caggtagcga gtctgggctt cggggacggc ggggagggga 480

gcccggacggg agg atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc 529
Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser
1 5 10

ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg 577
Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu
15 20 25

cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg 625
Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val
30 35 40

ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat 673
Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn
45 50 55 60

gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag 721
Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys
65 70 75

gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg 769
Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu
80 85 90

gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa 817
Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu
95 100 105

tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac 865
Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr
110 115 120

atc cac ccc gac tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc 913
Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro
125 130 135 140

gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc 961
Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly
145 150 155

cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata 1009
Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile
160 165 170

gtg aga gtt ggg ggt cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct 1057
Val Arg Val Gly Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro
175 180 185

gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca 1105
Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr
190 195 200

gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca 1153
Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala
205 210 215 220

ES 2 660 597 T3

aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc 1201
Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser
225 230 235

cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc 1249
Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser
240 245 250

acc ctg tgt cca cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc 1297
Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu
255 260 265

tcc ctc ccc tcc acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc 1345
Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser
270 275 280

cac cgg tcc tca ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct 1393
His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser
285 290 295 300

cca acc tat tct gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc 1441
Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser
305 310 315

cat gac aat tgg tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc 1489
His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu
320 325 330

ccc gtg agc cac aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc 1537
Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro
335 340 345

agc ctg tgg tct gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca 1585
Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala
350 355 360

gca gcc gtg tcc aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc 1633
Ala Ala Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro
365 370 375 380

gcg cac tac aca ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gcg ccc tct tcc tcg 1681
Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser
385 390 395

gga tcc cca ctg tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca gac atc gtg gac 1729
Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp
400 405 410

agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca 1777
Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr
415 420 425

cct gtg tcg cca cct tcc atg tga agcagcaagg cccaggtccc gaaagatgca 1831
Pro Val Ser Pro Pro Ser Met
430 435

gtgacttttt gtcgtggcag ccagtgggta ctggattgac ctactaggta cccagtggca 1891

gtctcagggtt aagaaggaaa tgcagcctca gtaacttcct tttcaaagca gtggaggagc 1951

acacggcacc tttcccaga gccccagcat cccttgctca cacctgcagt agcgggtgctg 2011

tcccaggtgg cttacagatg aacccaactg tggagatgat gcagttggcc caacctcact 2071

ES 2 660 597 T3

```

gacggtgaaa aaatgtttgc cagggtccag aaactttttt tggtttattt ctcatacagt      2131
gtattggcaa ctttggcaca ccagaatttg taaactccac cagtcctact ttagtgagat      2191
aaaaagcaca ctcttaatct tcttccttgt tgctttcaag tagttagagt tgagctgtta      2251
aggacagaat aaaatcatag ttgaggacag caggtttttag ttgaattgaa aatttgactg      2311
ctctgccccc tagaatgtgt gtattttaag catatgtagc taatctcttg tgttgttaaa      2371
ctataactgt ttcatatattt tcttttgaca aagtagccaa agacaatcag cagaaagcat      2431
tttctgcaaa ataaacgcaa tatgcaaaat gtgattcgtc cagttattag tgaagccct      2491
ccttttgtga gtatttactg tttattg      2518

```

<210> 15
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

```

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
 1          5          10          15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
          20          25          30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
          35          40          45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
 50          55          60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
65          70          75          80

Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
          85          90          95

Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
          100          105          110

Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
          115          120          125

Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
          130          135          140

Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
145          150          155          160

```

10

Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
 165 170 175
 Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
 180 185 190
 Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile
 195 200 205
 Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser
 210 215 220
 Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly
 225 230 235 240
 Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro
 245 250 255
 Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser
 260 265 270
 Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
 290 295 300
 Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Ser
 355 360 365
 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp

ES 2 660 597 T3

405

410

415

Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
420 425 430

Pro Ser Met
435

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de composiciones inmunoterápicas para su uso en un método para prevenir, mejorar o tratar al menos un síntoma de una enfermedad o afección en un individuo, para aumentar la supervivencia de un individuo que tiene la enfermedad o afección y/o para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica frente a uno o más antígenos en el individuo, en la que las composiciones comprenden:
- a) una primera composición inmunoterápica que comprende un virus variolovacunal recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican B7-1, ICAM 1 y LFA-3 y una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo; y
- b) una segunda composición inmunoterápica que comprende un vehículo de levadura que comprende al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo,
- en la que cada una de las composiciones inmunoterápicas primera y segunda comprende el mismo antígeno o dominio inmunógeno del mismo y en la que el método comprende administrar simultáneamente las composiciones inmunoterápicas primera y segunda como una dosis de sensibilización seguida de una dosis de refuerzo posterior que comprende la primera o la segunda composición inmunoterápica o ambas.
2. La combinación de composiciones inmunoterápicas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho método la administración simultánea de las siguientes composiciones de refuerzo al individuo después de la administración de las composiciones inmunoterápicas primera y segunda:
- a) una tercera composición inmunoterápica que comprende un virus de la viruela aviar recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican B7-1, ICAM-1 y LFA-3, y una secuencia de ácido nucleico que codifica el al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo; y
- b) la segunda composición inmunoterápica que comprende un vehículo de levadura que comprende el al menos un antígeno o dominio inmunógeno del mismo.
3. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la primera composición inmunoterápica comprende adicionalmente factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).
4. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el GM-CSF es proporcionado por un virus de la viruela aviar recombinante que codifica GM-CSF.
5. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el individuo tiene cáncer o en la que el individuo tiene una enfermedad provocada por o asociado a un patógeno.
6. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el individuo tiene cáncer y en la que el antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en:
- antígeno carcinoembrionario (CEA), oncoproteína Ras mutada, Brachyury, MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, oncoproteínas p53 normales y mutadas puntualmente, PSMA, tirosinasa, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, coli de poliposis adenomatosa (APC), Myc, proteína de von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógenos (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, mesotelina, NGEF, modificaciones de dichos antígenos, variantes de corte y empalme de dichos antígenos y agonistas de epítomos de dichos antígenos.
7. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el antígeno es antígeno carcinoembrionario (CEA).
8. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el CEA comprende un epítomo CAP1-6D.
9. La combinación para su uso de acuerdo con 5, en la que el individuo tiene una enfermedad o afección provocada por o asociada a un patógeno y en la que el antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en: antígenos víricos, antígenos fúngicos, antígenos bacterianos, antígenos helmínticos, antígenos parasitarios, antígenos ectoparasitarios y antígenos protozoarios.
10. Una combinación de composiciones inmunoterápicas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método para aumentar la supervivencia de un individuo con cáncer y/o para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica contra uno o más antígenos de cáncer en el individuo, en la que las composiciones comprenden:
- a) una primera composición inmunoterápica que comprende:

i) un virus variolovacunal recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican B7-1, ICAM-1 y LFA-3 y una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno de cáncer o dominio inmunógeno del mismo; y
ii) GM-CSF; y

5 b) una segunda composición inmunoterápica que comprende un vehículo de levadura que comprende al menos un antígeno de cáncer o dominio inmunógeno del mismo,

10 en la que cada una de las composiciones inmunoterápicas primera y segunda comprende el mismo antígeno de cáncer o dominio inmunógeno del mismo.

11. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, comprendiendo adicionalmente dicho método la administración simultánea de las siguientes composiciones de refuerzo al individuo después de la administración de las composiciones inmunoterápicas primera y segunda:

15 a) una tercera composición inmunoterápica que comprende:

i) un virus de la viruela aviar recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican B7-1, ICAM-1 y LFA-3 y una secuencia de ácido nucleico que codifica el al menos un antígeno de cáncer o dominio inmunógeno del mismo; y
ii) GM-CSF; y

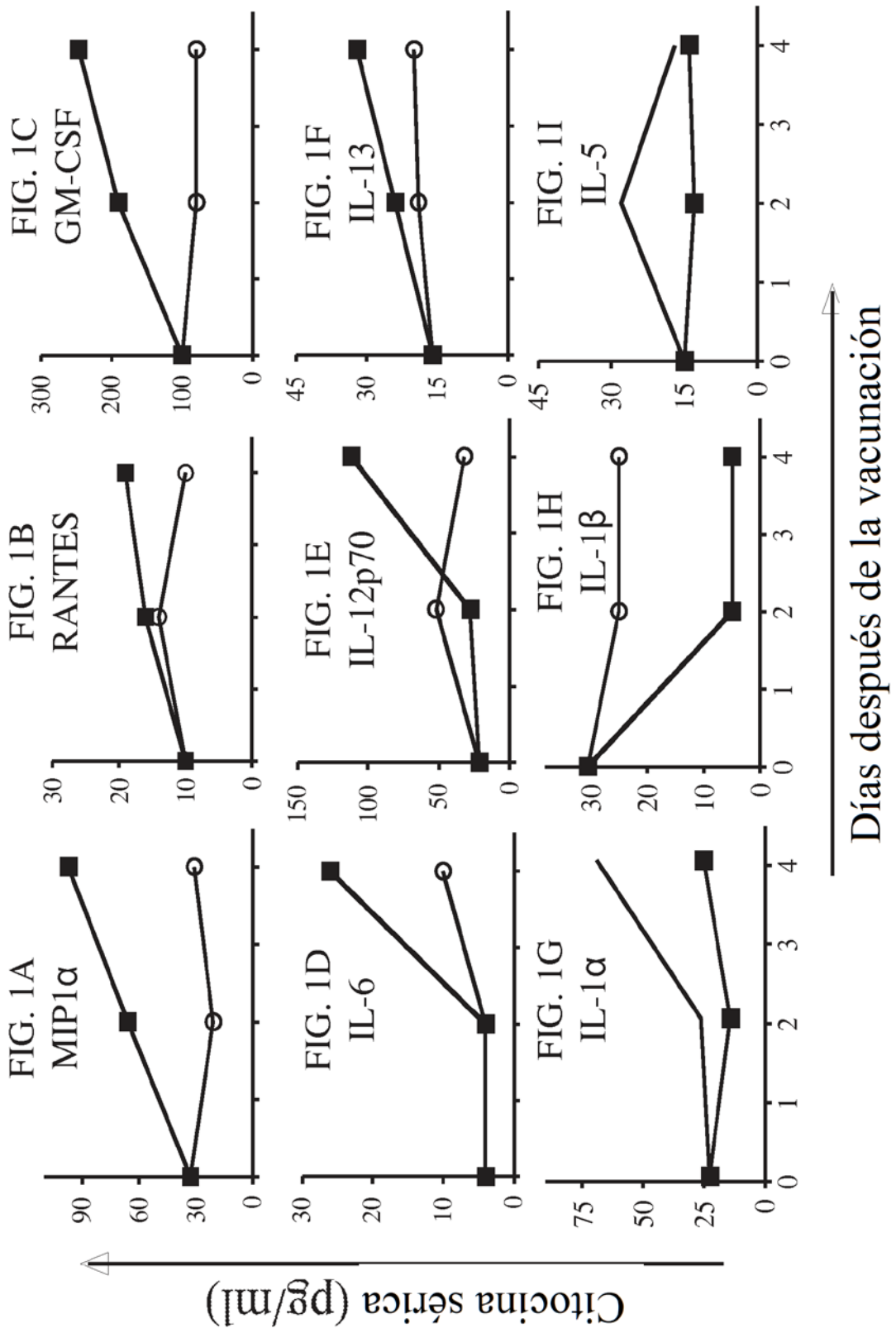
20 b) la segunda composición inmunoterápica que comprende un vehículo de levadura que comprende el al menos un antígeno de cáncer o dominio inmunógeno del mismo.

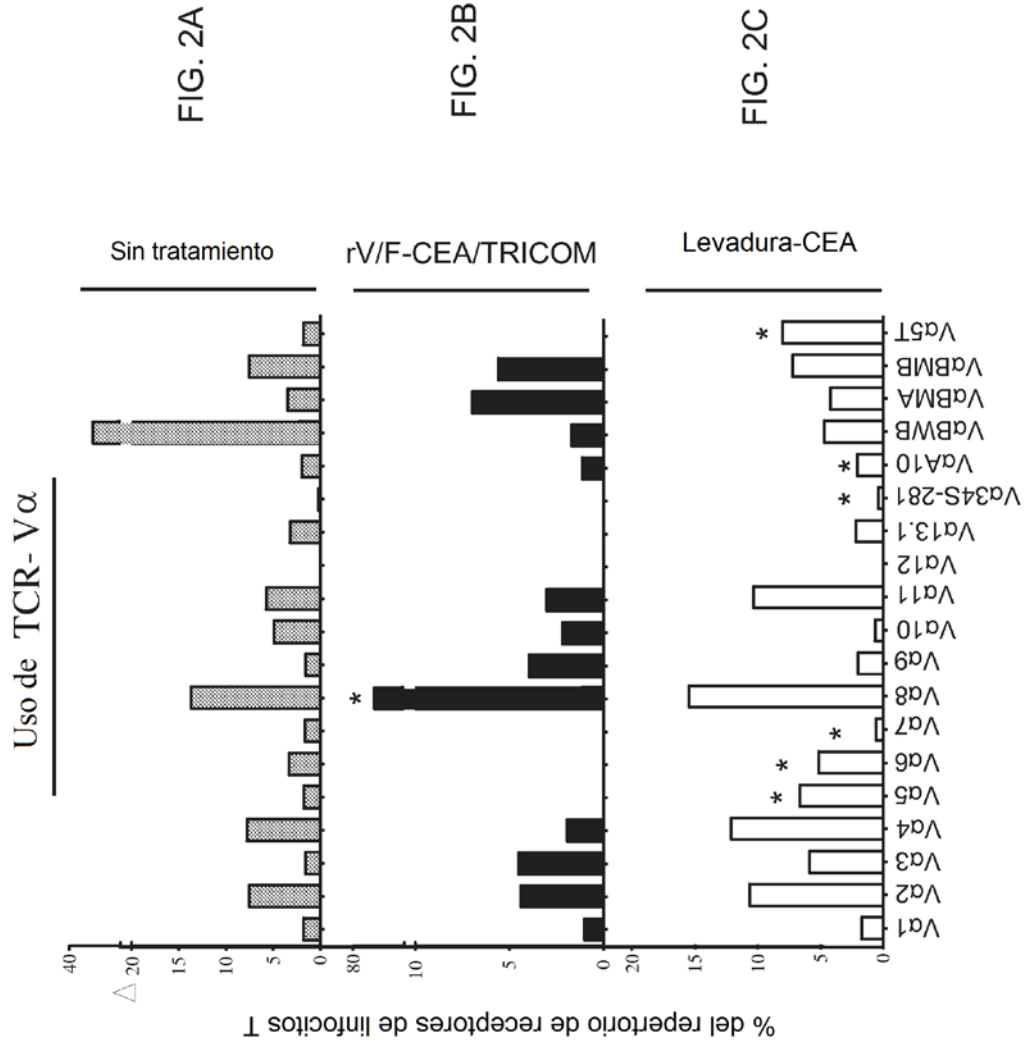
25 12. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que el GM-CSF es proporcionado por un vector vírico recombinante que codifica GM-CSF.

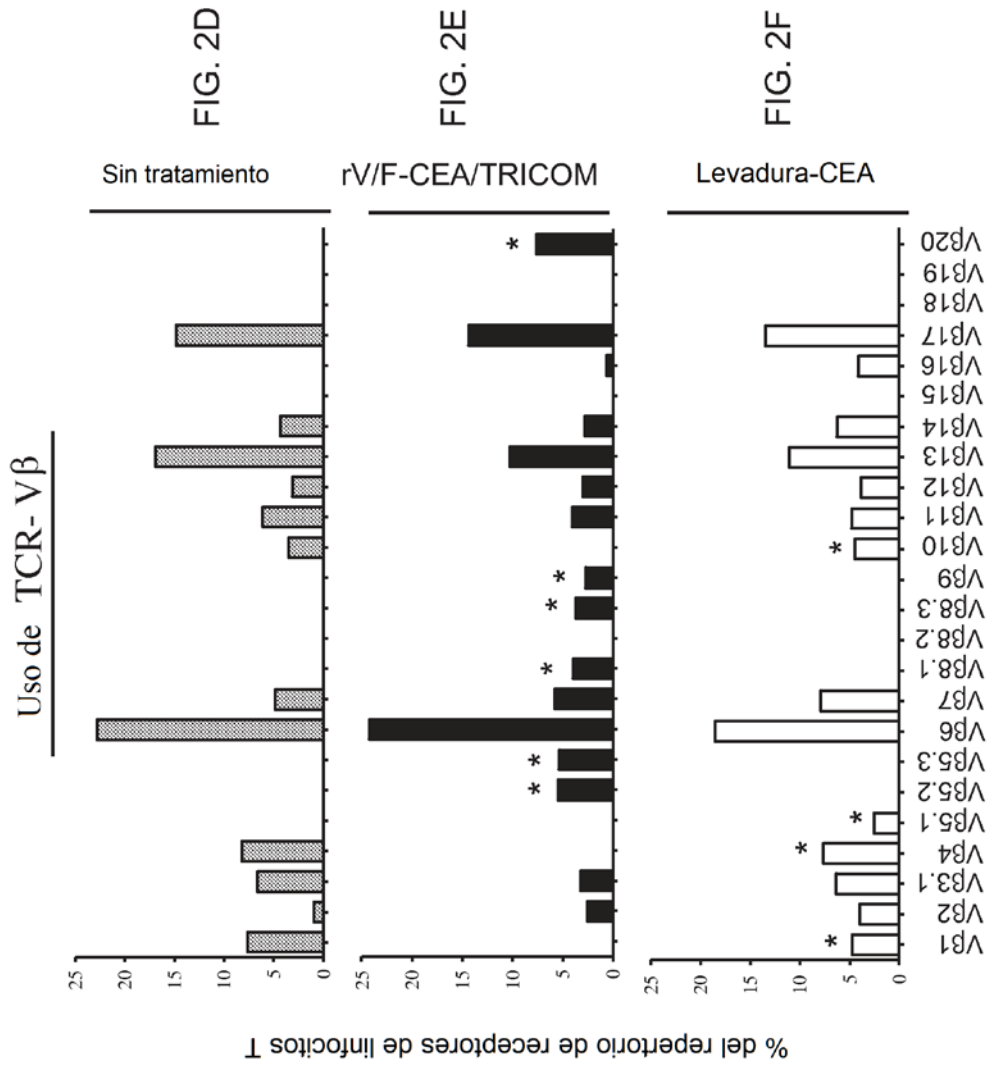
30 13. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el individuo se trata adicionalmente con quimioterapia y/o con radioterapia.

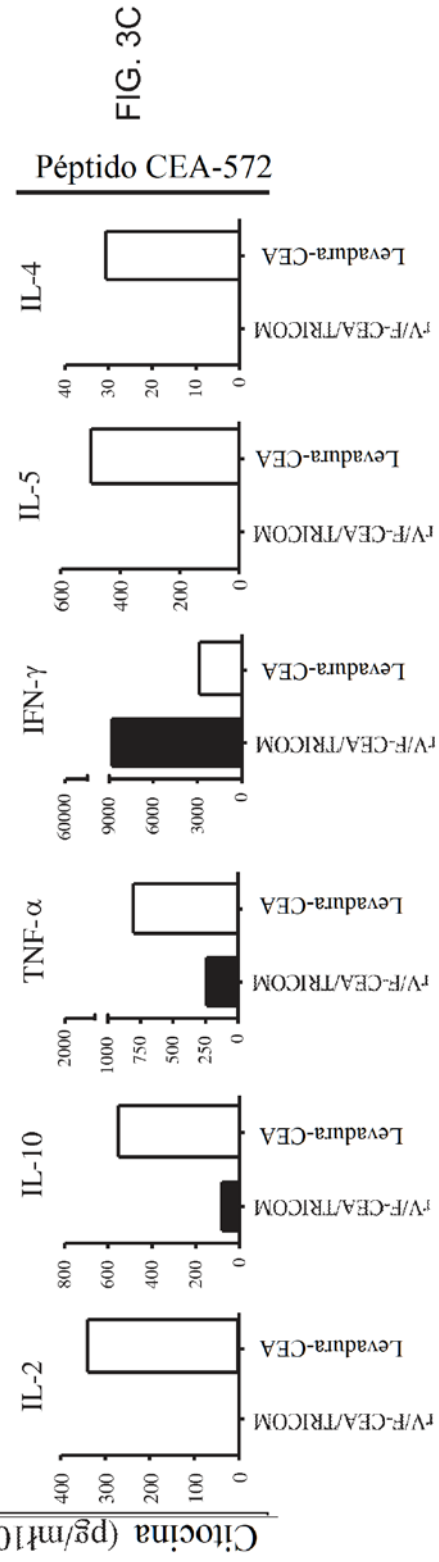
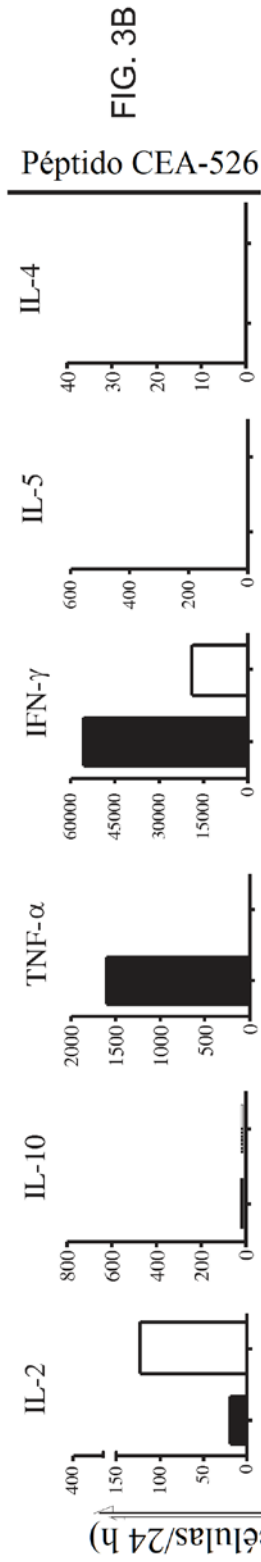
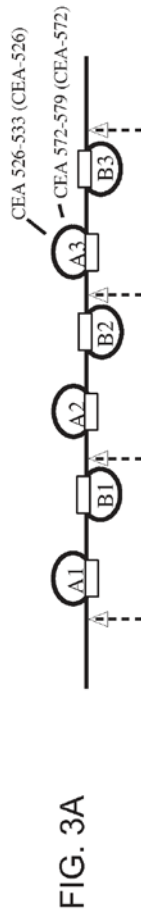
14. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el virus variolovacunal en la primera composición inmunoterápica es de virus variolovacunal Ankara modificado (MVA) o virus variolovacunal-cepa Wyeth; y
35 en la que el vehículo de levadura en la segunda composición inmunoterápica es una levadura entera, inactivada por calor; y/o
en la que el vehículo de levadura en la segunda composición inmunoterápica es de *Saccharomyces*.

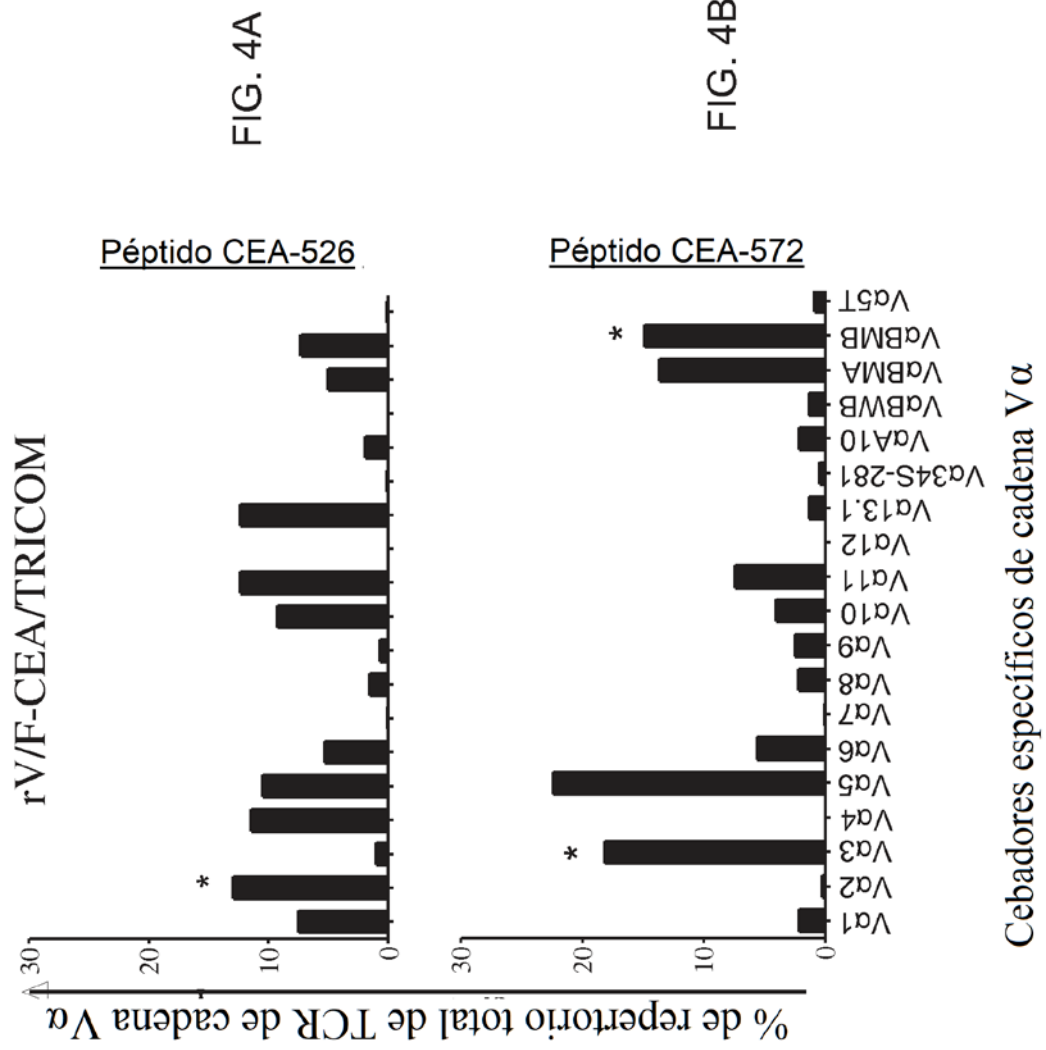
40 15. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que las composiciones inmunoterápicas primera y segunda se administran en diferentes sitios en el individuo; o en la que las composiciones inmunoterápicas primera y segunda se administran en el mismo sitio o en sitios adyacentes en el individuo.

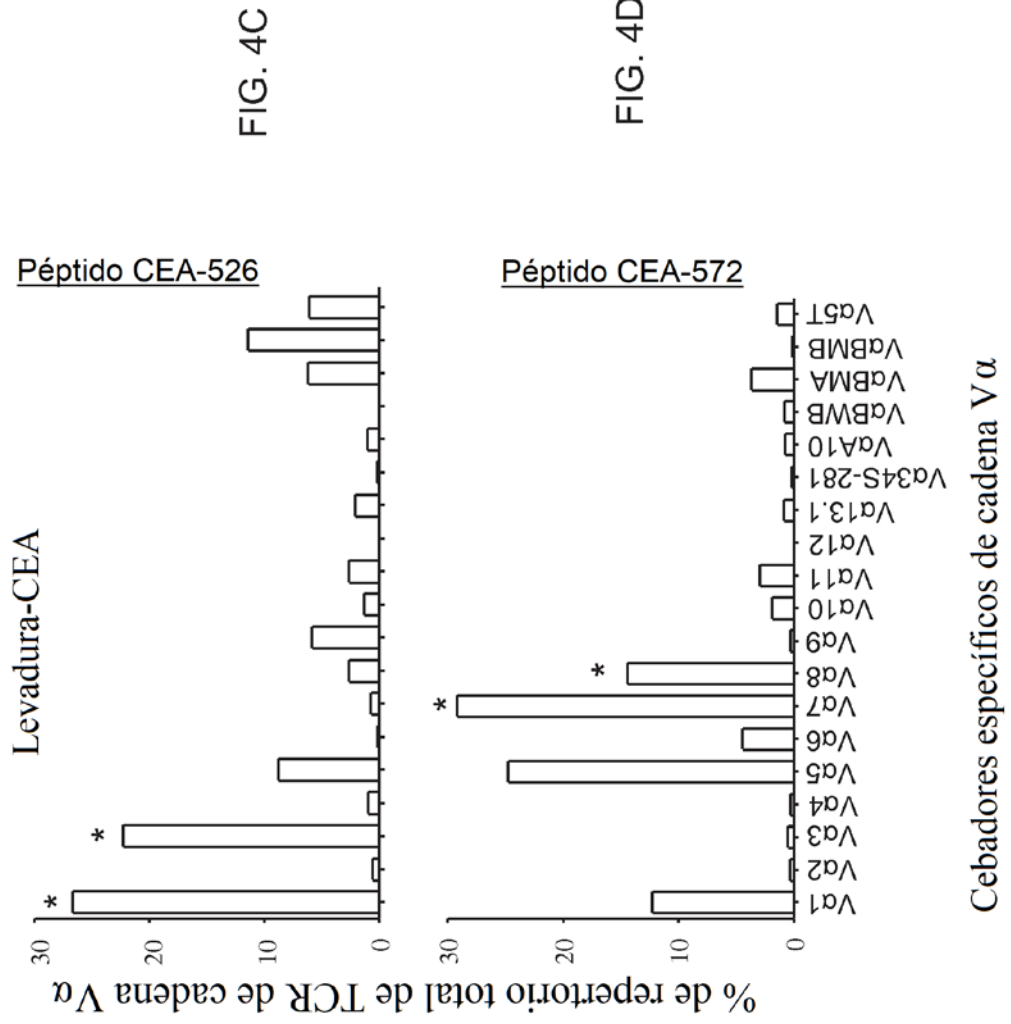












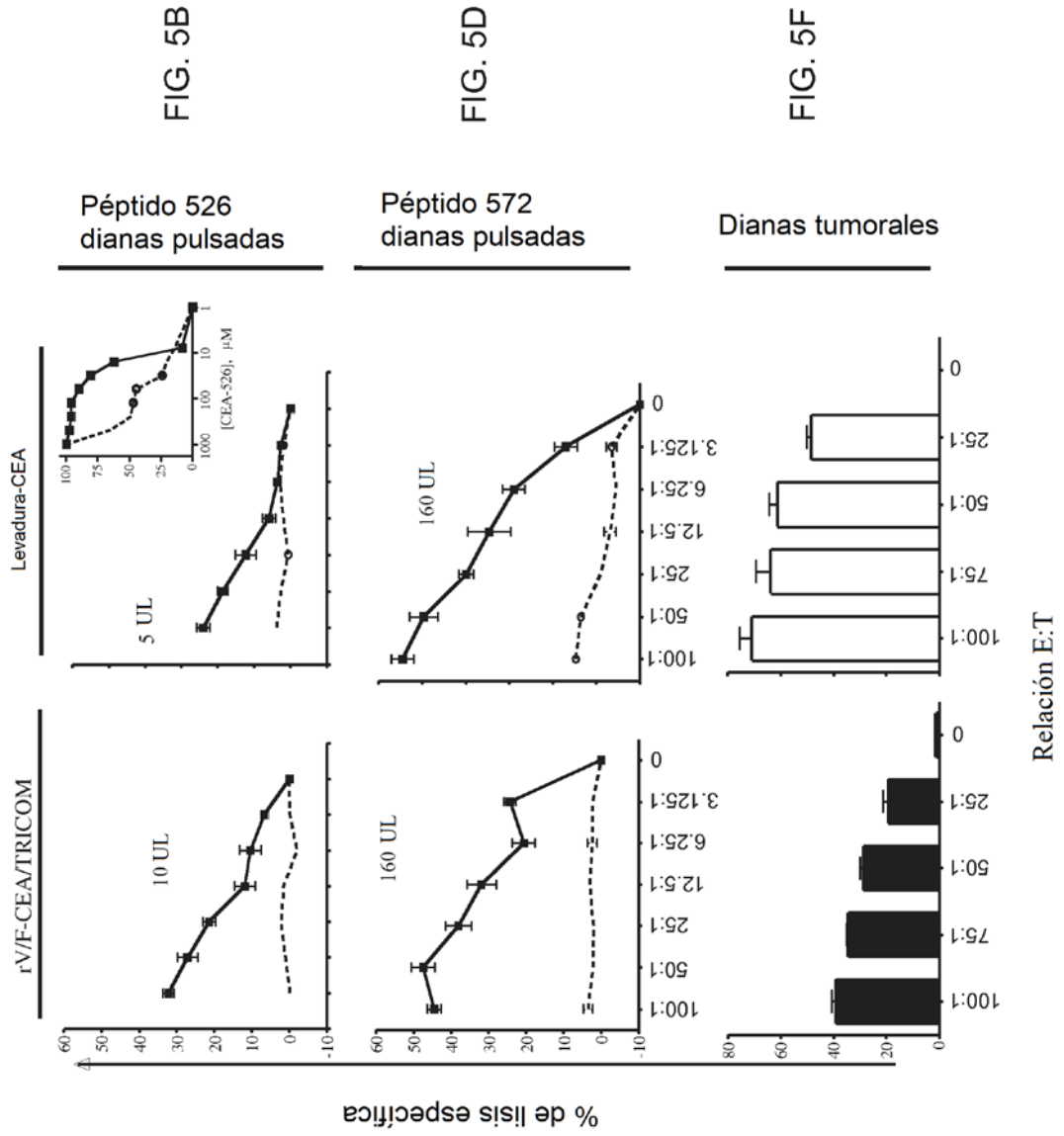


FIG. 6

